

EINE NEUE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE
METHODE ZUR QUANTITATIVEN TRENNUNG VON
CHLOROPLASTENFARBSTOFFEN UND DIE
ANWENDUNG DIESER METHODE BEI DER UNTER-
SUCHUNG LICHTBEDINGTER FARBSTOFF-
VERÄNDERUNGEN ETIOLIERTER AVENA-KEIMLINGE

THEA BERTENRATH

1965



Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

Direktor: Professor Dr. L. Brauner

EINE NEUE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE METHODE
ZUR QUANTITATIVEN TRENNUNG VON CHLOROPLASTENFARBSTOFFEN
UND DIE ANWENDUNG DIESER METHODE BEI DER UNTERSUCHUNG
LICHTBEDINGTER FARBSTOFFVERÄNDERUNGEN ETIOLIERTER AVENA-KEIMLINGE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Thea Bertenrath
aus Berlin

1965

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Hager
2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1965

Herrn Professor Dr. L. Brauner danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse an der Arbeit.

Für die Überlassung eines Themas, seine wertvollen Anregungen und seine stete Anteilnahme am Fortgang der Arbeit möchte ich Herrn Privatdozent Dr. A. Hager meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ferner danke ich an dieser Stelle Fräulein Bohm für die Ausführung der technischen Zeichnungen und Herrn Krause für die Photographien der Dünnschichtchromatogramme.

Inhaltsübersicht

=====

	Seite
I. Einleitung	1
II. Entwicklung einer neuen Trennmethodik	4
A. Verteilungschromatographische Methode	4
1. Versuche an Kieselgelschichten	4
2. Trennung an Schichten aus Mischungen verschiedener Träger	5
3. Verbesserte Trennung an Kieselgurschichten	6
4. Einführung eines Oxidationsschutzes	6
5. Leistungsfähigkeit der verteilungschromatographi- schen Trennung	8
B. Adsorptionschromatographische Methode	9
1. Versuche an Magnesiumoxidschichten	9
2. Verseifung der Chlorophylle im gelösten Gesamt- extrakt	10
3. Entwicklung basischer Träger zur Chlorophyllver- seifung auf der Dünnschichtplatte	11
III. Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Carotinoide	13
A. Xanthophylle	13
1. Rhodoxanthin	13
2. Zeaxanthin	14
3. Neoxanthin	15
4. Zone X ₁ (Neoxanthin-Isomeres)	16
5. Antheraxanthin (Zeaxanthin-5,6-epoxid)	18
6. Lutein	21
7. Violaxanthin	22
8. Lutein-5,6-epoxid	22
9. Zone X ₂ (a-Kryptoxanthin)	25
10. Zone X ₃ (a-Carotin-mono-epoxid)	25
11. Carotinbande	26

	Seite
B. Carotine	27
1. Lycopin	27
2. γ -Carotin	28
3. ξ -Carotin	28
4. β -Carotin	29
5. α -Carotin	30
IV. Untersuchungen klimatisch und genetisch bedingter Pigment- veränderungen an <i>Veratrum album</i> und <i>Thuja occidentalis</i> . .	31
A. <i>Veratrum album</i>	31
B. <i>Thuja occidentalis</i>	31
V. Quantitative Veränderungen von Chloroplastenfarbstoffen etiologierter Avena-Keimlinge unter dem Einfluß verschie- dener Lichtfrequenzen, verschiedener Temperaturen und den Hemmstoffen Streptomycin und Diphenylamin	33
A. Lichtinduzierte Pigmentveränderungen	35
1. Weißlicht	35
2. Starklicht	35
3. Rot- und Blaulicht	38
B. Diphenylamineinfluß auf die Pigmentveränderungen . . .	38
C. Streptomycineinfluß auf die Pigmentveränderungen . . .	41
D. Temperatureinfluß auf die Pigmentveränderungen	43
VI. Experimentelles	45
A. Versuchsmaterial	45
1. <i>Veratrum album</i>	45
2. <i>Thuja occidentalis</i>	45
3. <i>Avena sativa</i>	45
a. Anzucht	45
b. Belichtung	45
c. Lichtquellen	45
d. Diphenylamin und Streptomycin Inkubation	47
B. Blattfarbstoffextrakte	48
1. Herstellung	48
2. Verseifung	48
C. Düngschichtchromatographie	49
1. Bereitung der Dünnschichten und Trennmittelgemische	49
a. Verteilungschromatographie	49
b. Basische Adsorptionschromatographie	50
2. Elution der getrennten Farbstoffe vom Trägermaterial	50

	Seite
D. Charakterisierung der Pigmente	51
1. Messung der Spektren	51
2. Isomerisierung mit Jod ▼ ▼	52
3. Isomerisierung mit Salzsäure	52
E. Statistische Absicherung der Ergebnisse	53
VII. Diskussion	55
A. Trennmethodik	55
B. Quantitative Veränderungen von Chloroplastenpigmenten . .	57
VIII. Zusammenfassung	61
A. Trennmethodik	61
B. Quantitative Veränderungen von Chloroplastenpigmenten . .	62
IX. Literaturverzeichnis	64

I. Einleitung

=====

Mit der Entdeckung der "Kapillarwirkung des Papiers" durch RUNGE (1850 und 1855) und der darauf aufbauenden "Kapillaranalyse" von SCHÖNBEIN (1861) war der Grundstein für eine neue Methode zur Trennung und Charakterisierung von Substanzgemischen gelegt. Diese Arbeiten fanden damals jedoch nur geringe Beachtung; offensichtlich unabhängig von ihnen versuchte TSWETT das Problem der Stofftrennung an Adsorptionssäulen zu lösen. Er veröffentlichte 1903 eine erste Arbeit über die Trennung von Pflanzenfarbstoffen an einer großen Zahl von Adsorbentien unter Verwendung von verschiedenen Lösungsmittelgemischen (TSWETT 1903, 1906 und 1907). Erst nach mehr als zwei Jahrzehnten wurde die Chromatographie von Chloroplastenfarbstoffen erneut aufgegriffen und von verschiedenen Arbeitskreisen weiterentwickelt (KUHN und LEDERER 1931; SPOHN 1935, ZECHMEISTER und v. CHOLNOKY 1938, STROTT 1938, SEYBOLD und EGLE 1939 und 1943, SIMONIS 1939, STRAIN 1942 und 1945, KARRER und JUCKER 1946). So wurde beispielsweise an einer Stärkesäule die Auftrennung eines Blattfarbstoffextraktes in die beiden Chlorophylle, in Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin in einem Arbeitsgang möglich (HAGER 1956).

Einen methodischen Fortschritt bedeutete die Einführung der Papierchromatographie (CONSDEN, GORDON, MARTIN 1944), mit der ein Anschluß an die klassischen Arbeiten RUNGE's hergestellt wurde. Verschiedene Autoren versuchten nun die Chloroplastenpigmente mit Hilfe der Papierchromatographie zu trennen (BAUER 1952, ASAMI 1952, LIND, LANE, CLAESON 1953, SIRONVAL 1954). In diesen Arbeiten wurde jedoch nicht viel mehr erreicht "als eine sichtbare Auftrennung der Plastiden-Farbstoffe in die schon bekannten Komponenten" (HAGER 1956). Eine Verbesserung der Trennung versuchten auch STRAIN (1953), ANGAPINDU und Mitarbeiter (1958) und DOUIN (1953) durch die "Chromatographie mit Phasenumkehr" zu erreichen.

Eine gute Trennung der Blattfarbstoffe auf verteilungschromatographischer Grundlage wurde an Glasfaserpapier erzielt (HAGER 1959). Leider wird dieses Papier nicht mehr in der ursprünglichen Qualität hergestellt, so daß damit eine Trennung der Pigmente

nicht mehr möglich ist. Einen wirklichen Fortschritt auf dem Gebiet der quantitativen Trennung von Chloroplastenfarbstoffen bedeutete die Verwendung von Chromatographiekarton (Schleicher & Schüll 2071), der die vollständige Elution von ausreichenden Farbstoffmengen ermöglichte (HAGER 1957). Wegen der relativ langen Laufzeit (8 - 10 Stunden) dieser Chromatogramme war diese Methodik jedoch für Serienanalysen, wie sie in der vorliegenden Arbeit notwendig wurden, nur bedingt geeignet.

Für die geplanten Untersuchungen erschien die 1951 von STAHL eingeführte Dünnschichtchromatographie erfolgversprechend. Diese Methodik behält die Charakteristika säulenchromatographischer Trennungen grundsätzlich bei; der Übergang zur "offenen Säule" ist jedoch mit den Vorteilen erhöhter Trennschärfe, kürzerer Laufzeit der Chromatogramme, Erfassung von Substanzmengen im Gammabereich und ihrer leichteren Elution verbunden (STAHL 1962).

Versuche zur Trennung von Blattpigmenten an handelsüblichem Schichtmaterial (Kieselgel G) ergaben Fraktionierungen ohne ausreichende Trennschärfen, so daß quantitativen Angaben wegen der fehlenden Reinheit der Pigmente nur geringer Aussagewert zukommen kann (GROB, EICHENBERGER, PFLUGSHAUPT 1961).

Unter Anwendung des Prinzips der "Phasenumkehr" durch Imprägnieren von Dünnschichten mit Triglyceriden erreichte EGGER (1962) gute Trennungen von Chloroplastenfarbstoffen. Bei ihrer Elution werden jedoch Anteile der zur Imprägnierung verwendeten Fette mit abgelöst und stören eine direkte Bestimmung der Carotinoide. Die daher notwendige Abtrennung der Triglyceride durch Ausschütteln läßt Carotinoidverluste vermuten, so daß dieses Verfahren für quantitative Untersuchungen ungeeignet erscheint.

Die Problemstellung der vorliegenden Arbeit erfordert hingegen eine Methodik, die unter der Voraussetzung exakter Trennung der Chloroplastenpigmente ihre quantitative Erfassung ermöglicht, so daß folgende Forderungen erfüllt sein müssen:

1. Kurze Laufzeit der Chromatogramme
2. Hinreichend große Kapazität der Schichten, d.h. Darstellung anteilmäßig geringer Farbstoffkomponenten ohne Schwanzbildung bei den Hauptfraktionen

3. Schutz der empfindlichen Farbstoffe vor Autoxidation
4. Leichte und quantitative Eluierbarkeit der Farbstoffe aus der Trägerschicht
5. Verhinderung von Isomerisationen durch die Schichtsubstanzen
6. Unkomplizierte Handhabung

Wie in einer Kurzmitteilung (HAGER und BERTENRATH 1962) bereits dargelegt worden ist, konnte das Ziel einer dünnschicht-chromatographischen Trennung und quantitativen Erfassung von Chloroplastenfarbstoffen erreicht werden. In der folgenden Arbeit wird die Methodik erstmals eingehend beschrieben und im zweiten Teil dieser Arbeit zusammen mit den an etiolierten Avena-Keimlingen erhaltenen Befunden diskutiert.

II. Entwicklung einer neuen Trennmethodik

Ein wichtiger Vorteil verteilungschromatographischer Trennungen, die auf einer vielfach wiederholten Gleichgewichtseinstellung der zwischen stationärer und mobiler Phase verteilten Substanzen beruhen, liegt in der Möglichkeit der sauberen Trennung relativ großer Stoffmengen. Dieser Gesichtspunkt verdient vor allem dann Beachtung, wenn neben den Hauptkomponenten noch anteilmäßig sehr gering vorhandene Substanzen erkannt werden sollen. Sind im Stoffgemisch jedoch Komponenten mit nur wenig unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten enthalten, so wird deren Trennung am Dünnenschichtchromatogramm unvollständig sein. Solche Stoffpaare können jedoch noch häufig durch adsorptionsschromatographische Verfahren getrennt werden. Dabei muß allerdings die geringe Kapazität der Schichten in Kauf genommen werden. Die Vor- und Nachteile der verteilungs- und adsorptionsschromatographischen Verfahren werden durch die nachstehend beschriebenen Versuche wegen der vergleichenden Anwendung beider Chromatographiearten besonders deutlich.

A. Verteilungschromatographische Methode

1. Versuche an Kieselgelschichten

Zunächst wurde versucht, die Blattfarbstoffe an Kieselgelschichten zu trennen; dabei war zu beobachten, daß mit Fließmittelsystemen, die Kohlenwasserstoffe (z.B. Petroläther) und Alkohole (z.B. Isopropanol) etwa im Verhältnis 10 : 1 enthalten, eine Auftrennung von Chloroplastenfarbstoffen in drei Xanthophyll-, eine Chlorophyll- und eine Carotinbande erreicht wird. Aceton und Chloroform verhalten sich ähnlich wie niedere Alkohole. Allen Trennungen gemeinsam ist der Nachteil eines offensichtlichen Chlorophyllabbaus im Verlaufe der Entwicklung des Chromatogramms. Die Abbauprodukte der Chlorophylle bleiben hinter der Bande des intakten Chlorophylls zurück und verunreinigen die Xanthophylle, ohne jedoch scharfe Zonen zu bilden. Dieser Effekt ist wahrschein-

lich durch die saure Reaktion (pH 6,6) von Kieselgel G (Merck 7731) bedingt, da er, wie im folgenden beschrieben, nach Zugabe basischer Trägersubstanzen nicht mehr beobachtet wird.

2. Trennung an Schichten aus Mischungen verschiedener Träger

Trärgemische dürfen in wäßriger Suspension nicht sauer reagieren und die getrennten Pigmente müssen quantitativ von ihnen ablösbar sein. Diese Bedingungen werden erfüllt von Kieselgur, Kieselgel und CaCO_3 , nicht aber von ZnCO_3 , MgO und Al_2O_3 , die vor allem Chlorophylle irreversibel adsorbieren. Verwendet man ein Gemisch aus Kieselgel G (12 g), Kieselgel "unter 0,08 mm" (3 g) und CaCO_3 (3 g) als Trägerschicht und entwickelt die Chloroplastenfarbstoffe mit Benzin (140 - 150° C) : Isopropanol = 100 : 13, so ergibt sich, den steigenden Verteilungskoeffizienten der Farbstoffe entsprechend, eine Auftrennung in folgende Zonen:

1. Neoxanthin, 2. Violaxanthin, 3. Antheraxanthin, 4. Lutein mit Zeaxanthin, 5. Chlorophyll b, 6. Chlorophyll a, 7. Carotine.

Da aber die Einzelbanden noch sehr dicht beeinander liegen, vor allem die der Chlorophylle, ist eine fehlerfreie Gewinnung der Farbstoffe mit Schwierigkeiten verbunden.

3. Verbesserte Trennung an Kieselgurschichten

Die Verwendung eines Gemisches von 12 g Kieselgur G, 3 g Kieselgel "unter 0,08 mm" und 3 g CaCO_3 unter Beibehaltung des oben genannten Fließmittelsystems bringt den Vorteil einer besseren Auftrennung der Xanthophylle, so daß die jetzt genügend weit auseinander liegenden Banden (vergl. Abb. 1) quantitativ gewonnen werden können. Eine weitere Verbesserung bedeutet ein geringfügiger Wasserzusatz zum Fließmittel: entwickelt man im System Benzin ($100 - 140^\circ \text{C}$) : Isopropanol : Wasser = 100 : 10 : 0,25, so trennen sich auch die beiden Chlorophylle besser als zuvor.

Zur quantitativen Bestimmung der getrennten Farbstoffe werden die einzelnen Banden in eine Glasfritte geschabt, eluiert und die Konzentrationen durch Messung der Extinktionen bestimmt. Dabei hat ein Vergleich der gewonnenen Spektren mit den in der Literatur angegebenen (HAGER 1956) gezeigt, daß die Absorptionsmaxima, besonders der Epoxide, in den kurzwelligen Bereich verschoben sind. Dieser Effekt wird stärker, wenn die Farbstoffe nicht sofort nach der Entwicklung der Chromatogramme eluiert werden. Da jedoch nicht alle Farbstoffe gleichzeitig in Lösungsmittel aufgenommen werden können, ist der Effekt bei den zuletzt gelösten naturgemäß am größten. Schon zehn Minuten nach Abschluß der Chromatographie beträgt die Verschiebung der Absorptionsmaxima 15 nm. Zu dieser Zeit ist sowohl ein allgemeines Ausbleichen der Pigmente, als auch eine bläuliche Umfärbung der Epoxide zu beobachten, was einerseits auf den Licht- und Luftsauerstoffeinfluß, andererseits auf eine gewisse Azidität der Trägerschicht zurückzuführen ist. Hiermit kann auch die Verschiebung der Absorptionsmaxima erklärt werden.

4. Einführung eines Oxidationsschutzes

Es konnte gezeigt werden, daß die Voraussetzungen einer ausreichenden Wirksamkeit als Oxidationsschutz, verbunden mit fehlender Absorption im Spektralbereich der Chloroplastenfarbstoffe, von Ascorbinsäure in nahezu idealer Weise erfüllt werden. Bereitet

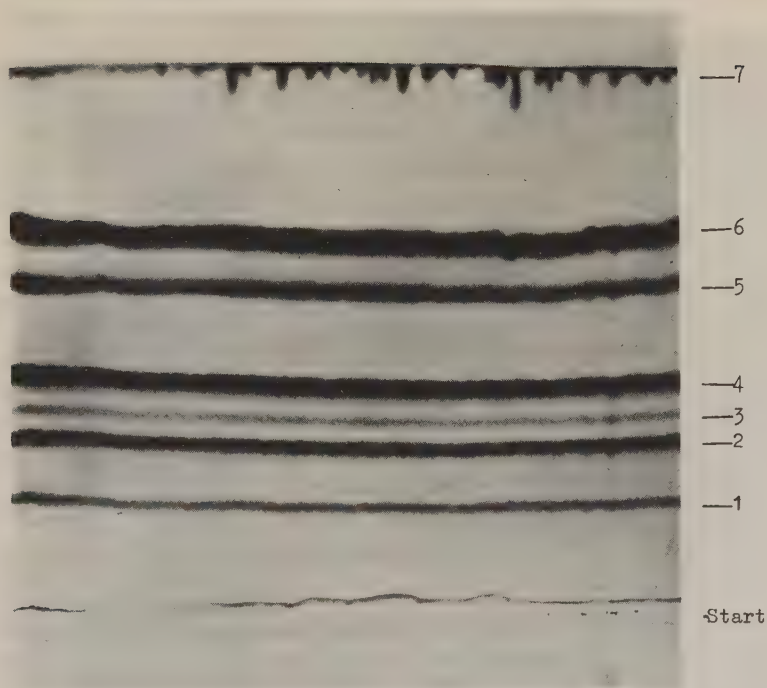


Abb. 1a

Dünnschichtchromatogramm eines Blattextraktes von *Hedera helix*.

Trägermaterial: Kieselgur G, Kieselgel "unter 0,08 mm", Calciumcarbonat, Calciumhydroxid, wäßrige Ascorbinsäurelösung.

Trennmittelgemisch: Benzin, Isopropanol, Wasser.

Zonen: 1 Neoxanthin, 2 Violaxanthin, 3 Antheraxanthin und Lutein-5,6-epoxid, 4 Lutein und Zeaxanthin, 5 Chlorophyll b, 6 Chlorophyll a- und β -Carotin.

man die Dünnschichten unter Zusatz von $8 \times 10^{-3} \text{ m}$ Ascorbinsäurelösung an Stelle von Wasser und stellt durch Zugabe von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ einen pH von 7,1 - 7,4 ein, so wird die Farbstoffzerstörung soweit herabgesetzt (Abb. 1a), daß eine Verschiebung der Absorptionsmaxima nicht mehr auftritt. Die Trennung der Farbstoffe wird nicht beeinflusst. Die Wirksamkeit des Ascorbinsäurezusatzes wird beim Vergleich der Abb. 1a und 1b besonders deutlich.

Abb. 1a



Abb. 1b

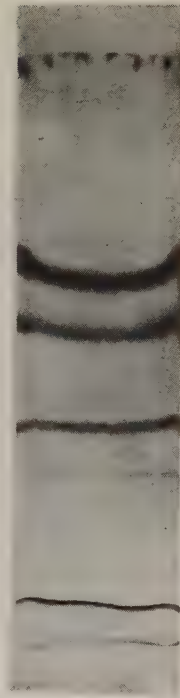


Abb. 1a und 1b

Dünnschichtchromatogramm (wie in der Legende Abb. 1a beschrieben)
30 Minuten nach Beendigung der Trennung; a) mit Ascorbinsäure,
b) ohne Ascorbinsäure

5. Leistungsfähigkeit der verteilungschromatographischen Trennung

Das Bestreben, eine schnelle, einfache und zuverlässige Methode zur quantitativen Erfassung von Chloroplastenfarbstoffen zu erarbeiten, ist in zufriedenstellendem Umfang gelungen. Die eingangs aufgestellten Forderungen sind im einzelnen folgendermaßen erfüllt:

1. Die Chromatogramme werden in nur 45 Min. entwickelt.
2. Die Kapazität einer Platte erlaubt die Auftrennung eines Extraktes aus 0,5 g grünen Blattmaterials (Frischgewicht).
3. Durch die Zugabe von Ascorbinsäure wird eine Oxidation der Farbstoffe weitgehend vermieden.
4. Die Farbstoffe können schnell und quantitativ eluiert werden, da die zur Verteilungschromatographie verwendete Trägerschicht eine Adsorption ausschließt.
5. Isomerisierungen werden nicht beobachtet.
6. Die Trennung der Farbstoffe in einem Arbeitsgang und ihre direkte Überführung in Lösungsmittel, die zur Extinktionsmessung geeignet sind, ermöglichen ein schnelles Arbeiten, wie es bei vergleichenden Serienanalysen notwendig ist.

In der Abb. 1 ist ein typisches Chromatogramm aus Blattextrakten dargestellt, in dem jedoch α - und β -Isomere noch gemeinsam wandern, so daß keine Trennung von α - und β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin sowie Lutein-5,6-epoxid und Zeaxanthin-5,6-epoxid (Antheraxanthin) eintritt. Für die später beschriebenen Untersuchungen hingegen ist insbesondere die Auftrennung von Lutein und Zeaxanthin notwendig.

Um eine Rechromatographie dieser Lutein-Zeaxanthin-Bande zu vermeiden, einen Arbeitsgang, der bei quantitativen Arbeiten zu Ungenauigkeiten führen kann, sind die nachstehend geschilderten Trennversuche unternommen worden, die nach dem Prinzip einer Adsorptionschromatographie arbeiten.

B. Adsorptionschromatographische Methode

1. Versuche an Magnesiumoxidschichten

Die nach Angaben aus der Literatur (RANDERATH 1962) durchgeführte Dünnschichtchromatographie von Lutein und Zeaxanthin an MgO enthaltenden Trägern ergibt zwar eine Trennung, hat aber bei der Chromatographie von Gesamtextrakten den Nachteil, daß die Chlorophylle die anderen Pigmente (Xanthophylle) überlagern. Es

wurde daher zunächst versucht, die Chlorophylle durch Verseifung aus dem Gesamtextrakt zu entfernen, wobei die Frage gestellt werden muß, ob die Quantität der Carotinoide gewahrt bleibt.

2. Verseifung der Chlorophylle im gelösten Gesamtextrakt

Nach dem von KARRER und JUCKER (1948) angegebenen Verfahren wird der Blattextrakt mit methanolischer KOH-Lösung verseift, gegen Petroläther ausgeschüttelt und die in der Epiphasse gelösten Carotine und Xanthophylle chromatographiert. Leider ergibt sich bei einem Vergleich mit unverseiften Proben, daß diese Methode wegen nachweisbarer Carotinoidverluste und ihres großen Zeitaufwandes für quantitative Serienanalysen ungeeignet ist. Die Abnahme der Xanthophylle und der Carotine ist hauptsächlich auf Verluste beim Ausschütteln, aber auch auf ihren Abbau durch KOH zurückzuführen, der mit steigender KOH-Konzentration zunimmt (Abb. 2)

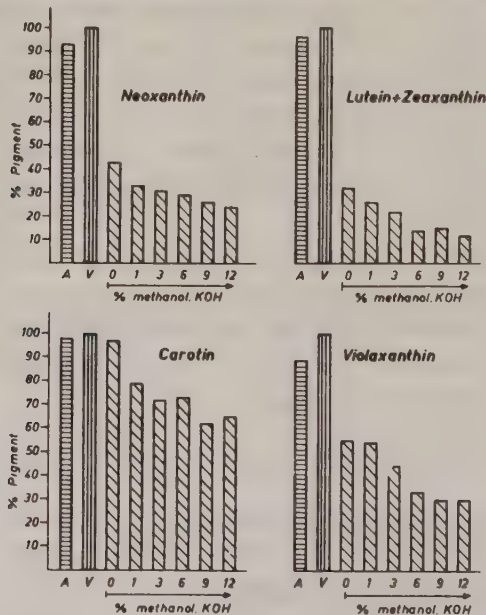


Abb. 2

Carotinoidverluste beim Verseifen des Chlorophylls im Gesamtextrakt. Grünes Blattmaterial wurde in Aceton extrahiert: aus dem Acetonextrakt a) adsorptionschromatographisch v) verteilungschromatographisch gewonnene Pigmentmenge. 0 - 12) 10 ml Acetonextrakt wurde versetzt mit 1 ml 0-12%iger methanolischer KOH, verseift, gegen Petroläther ausgeschüttelt und verteilungschromatographisch getrennt.

3. Entwicklung basischer Träger zur Chlorophyllverseifung auf der Dünnschichtplatte

Um die Nachteile einer verlustreichen Ausschüttelung und der eben geschilderten Carotinoidzerstörung zu umgehen, wird eine Verseifung der Chlorophylle direkt auf der Dünnschichtplatte bei einer Basizität des Trägermaterials versucht, die wohl eine Verseifung der Chlorophylle, nicht aber eine Zerstörung der Carotinoide bewirkt.

Die Chromatographie an einer Mischung aus Kieselgur G (8g), MgO (7g), Ca(OH)_2 (4g) ergibt eine zufriedenstellende Carotinoidtrennung, jedoch noch nicht eine vollständige Chlorophyllverseifung. Diese wird erreicht, wenn die Trägersubstanzen nicht mit reinem Wasser, sondern mit KOH-Lösung (70 ml, 3 %ig) zur Bereitung der Dünnschichtplatten verrührt werden, so daß die Carotinoidzonen jetzt frei sind von sie überlagernden Chlorophyllen.

Eine optimale Carotinoidtrennung bei ebenfalls vollständiger Chlorophyllverseifung wurde bei Verwendung eines Gemisches aus CaCO_3 (24g), MgO (5g), Ca(OH)_2 (4g) und 50 ml 1,7 %iger KOH erreicht. Die Entwicklung erfolgt im System Benzin (100-140°C) : Chloroform : Aceton = 1 : 1 : 1 (Abb.3c) Bei der Chromatographie von Pflanzenmaterial mit geringem Chlorophyllgehalt, wie das sowohl bei etiolierten als auch bei acht Stunden belichteten Avena-Keimlingen der Fall ist, erübrigt sich der KOH-Zusatz zur Adsorptionsschicht.

Die Abbildungen 3b und 3a sollen die Lage der einzelnen Pigmente im Chromatogramm zueinander demonstrieren.

Abb.3a gibt ein Dünnschichtchromatogramm eines Karottenextraktes wieder, dem Lycopin zugesetzt wurde. Die selektive Trennung der Carotine wurde durch Änderung des Fließmittels erreicht. (Benzin : Benzol : Aceton = 40 : 10 : 1); die Xanthophylle wandern jetzt kaum.

Abb.3b zeigt ein Chromatogramm aus den gemischten Extrakten von Avena, Zea mays, und Thuja, in denen zur besseren Sichtbarmachung die Pigmente Antheraxanthin, Lutein-5,6-epoxid und Zeaxanthin zusätzlich noch etwas angereichert wurden.

Abb.3c stellt ein typisches Chromatogramm dar, wie man es von dem Extrakt isolierter Spinatchloroplasten erhält.

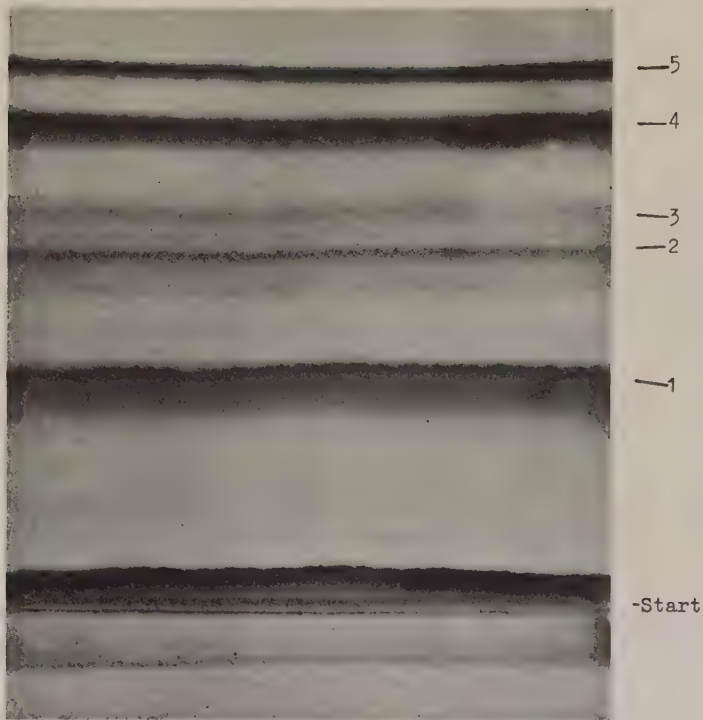


Abb. 3a

Adsorptionschromatogramm der Carotine

Dünnschicht: Calciumcarbonat, Magnesiumoxid, Calciumhydroxid

Trennmittelgemisch: Benzin, Benzol, Aceton

Zonen: 1 Lycopin, 2 γ -Carotin, 3 ξ -Carotin, 4 B-Carotin
5 a-Carotin

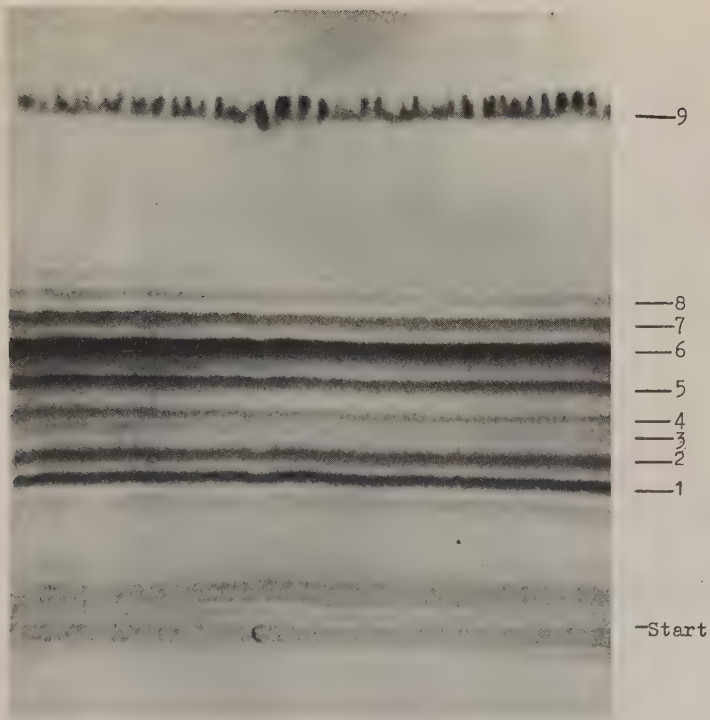


Abb.3b

Adsorptionschromatogramm der Xanthophylle

Dünnschicht: Calciumcarbonat, Magnesiumoxid, Calciumhydroxid

Trennmittelgemisch: Benzin, Chloroform, Aceton

Zonen: 1 Rhodoxanthin, 2 Zeaxanthin, 3 Neoxanthin, 4 Neoxanthin-
Isomeres, 5 Antheraxanthin, 6 Lutein, 7 Violaxanthin,
8 Lutein-5,6-epoxid, 9 Gesamtcarotin

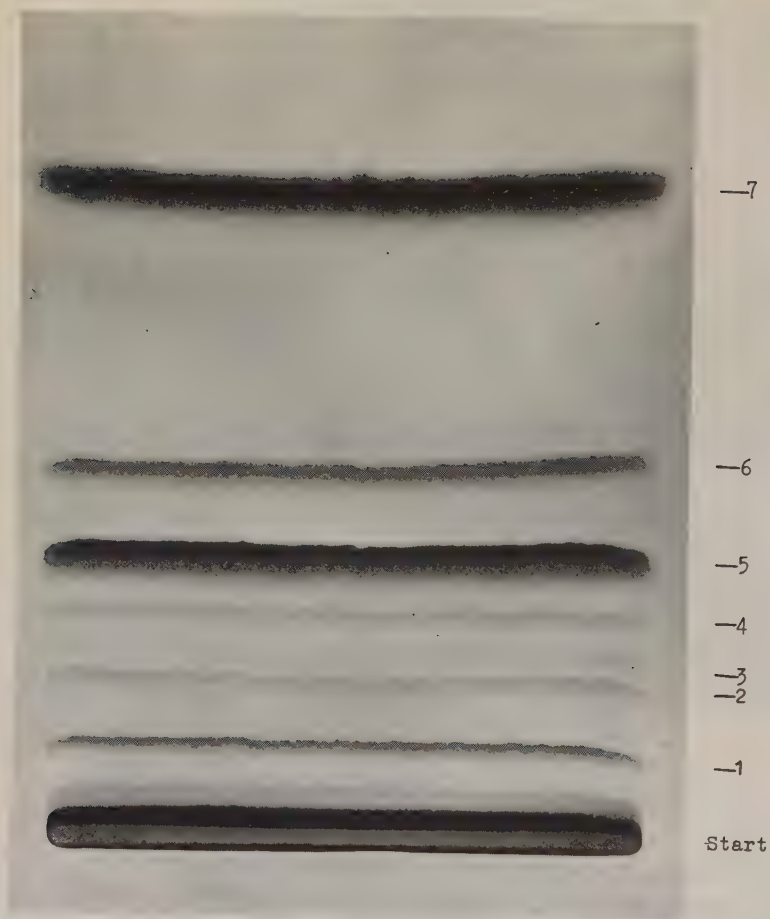


Abb. 3c

Typisches Adsorptionschromatogramm eines aus Spinatchloroplasten gewonnenen Pigmentextraktes

Dünnschicht: Calciumcarbonat, Magnesiumoxid, Calciumhydroxid und KOH-Lösung

Trennmittelgemisch: Benzin, Chloroform, Aceton

Zonen: 1 Zeaxanthin, 2 Neoxanthin, 3 Neoxanthin-Isomeres, 4 Anthraxanthin, 5 Lutein, 6 Violaxanthin, 7 B-Carotin

III. Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Carotinoide

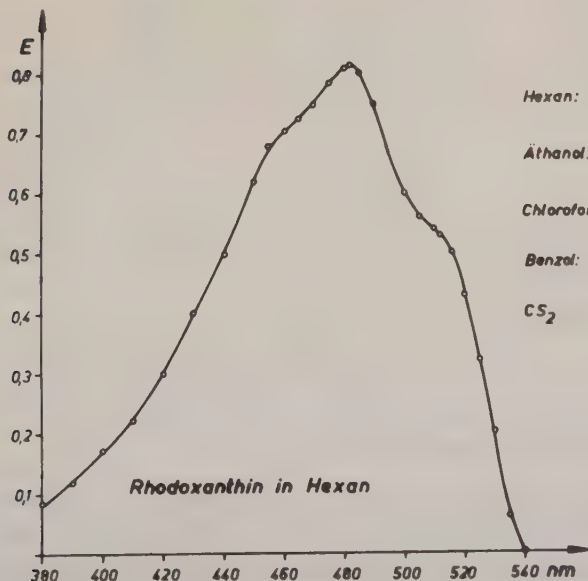
Das in Abb. 3b gezeigte Chromatogramm gibt einen Überblick über die Reihenfolge der getrennten Farbstoffzonen, deren Auftreten im Einzelfall von der Art des extrahierten Materials abhängt. Ihre Identifizierung bzw. Charakterisierung ist mit Hilfe folgender Methoden durchgeführt worden:

1. Messung der Absorptionsspektren (Vergleich der Verläufe und Lagen der Maxima).
2. Wanderungsgeschwindigkeit an verschiedenen Adsorbentien und variierten Fließmittelgemischen, Vergleich mit bekannten Substanzen.
3. Isomerisierung mit Jod (Identifizierung von aufgetretenen cis-trans-Isomeren aufgrund veränderter Spektren).
4. Isomerisierung mit Salzsäure (Verschiebung des Absorptionsmaximums nach Umwandlung in die furanoide Form).

In den folgenden Kapiteln werden die Pigmente einzeln besprochen.

A. Xanthophylle

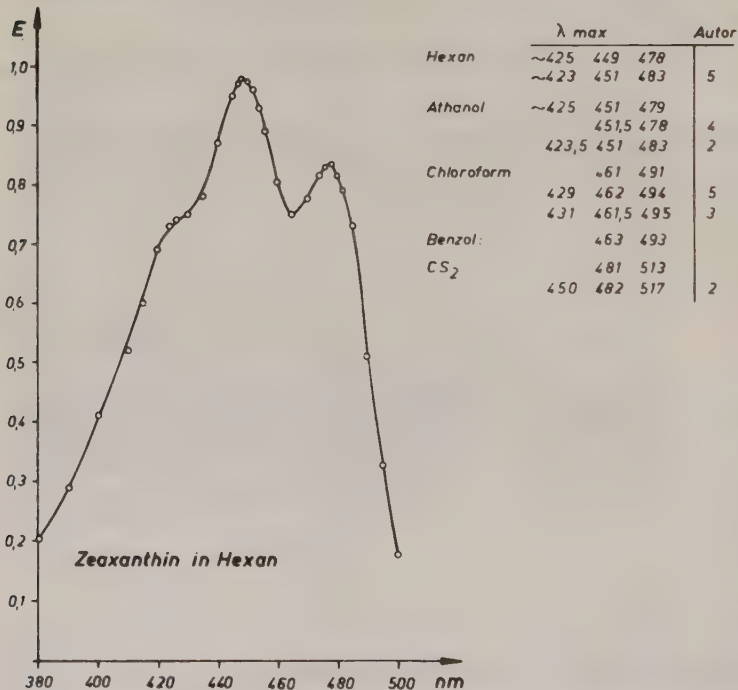
1. Rhodoxanthin, gewonnen aus Thuja occidentalis (Abb. 4)



	λ_{max}			Autor
Hexan:	~ 460	482	~ 512	3
	458	489	524	
Äthanol:	495			2 u. 3
	496	530		
Chloroform:		501		2 u. 3
	482	510	546	
Benzol:		498		2
	474	503,5	542	
CS ₂		515		2
	491	525	564	

Dieses Pigment kommt besonders stark im Winter in Zweigen von *Thuja occidentalis* vor, weswegen es auch von TSWETT (1911) als Thujarhodin beschrieben wurde. Aber auch in anderen Coniferen sowie in *Potamogeton* (Helobiae) wurde es gefunden. (KARRER und JUCKER 1948 und eigene Experimente). Rhodoxanthin läuft auf der verteilungschromatographischen Platte direkt unter Chlorophyll b und erscheint auf der adsorptionschromatographischen Platte als unterste Zone. In allen Lösungsmitteln wird nur ein ausgeprägtes Maximum gemessen, in Hexan treten zusätzlich zwei Schultern im Absorptionsspektrum auf.

2. Zeaxanthin, gewonnen aus etiolierten Avena-Keimlingen (Abb. 5)

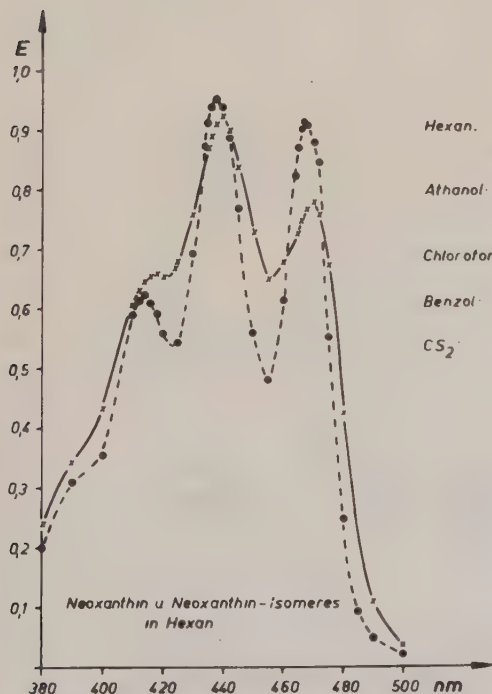


Dieser Farbstoff tritt in wechselnden Mengen in grünen Pflanzen auf, besonders in den stark belichteten Teilen. Er läuft auf der verteilungschromatographischen Dünnschichtplatte mit Lutein

zusammen. Zeaxanthin ist chemisch ein 3,3'-dihydroxy- β -Carotin, während es sich bei Lutein um ein 3,3'-dihydroxy- α -Carotin handelt. Auf der adsorptionschromatographischen Dünnschichtplatte wird Zeaxanthin stärker adsorbiert als Lutein, so daß eine Trennung resultiert.

3. Neoxanthin, gewonnen aus etiolierten Avena-Keimlingen

Das verteilungschromatographisch einheitlich laufende Pigment trennt sich bei Anwendung der adsorptionschromatographischen Methode in zwei Zonen auf (vgl. Abb. 3b), wobei die untere an Hand ihres Spektrums (Abb. 6) als Neoxanthin identifiziert wird. Die obere Bande wird als Zone X_1 bezeichnet und nachfolgend charakterisiert.



	Neoxanthin			Autor	Neoxanthin-Isomeres		
	λ max				λ max		
Hexan.	414	438	467		418	440	470
		436	467	4			
		437	466	5			
Athanol.	416	439	468		420	442	472
	414	437	466	4			
		437	467	3			
Chloroform	423	448	478		427	451	481
		447	476	5 u 3			
Benzol	424	449	480		482	452	483
		447	477	5 u 3			
CS ₂	439	465	497		468	501	
		463	493	5 u 3			

Abb. 6

Absorptionsspektrum des Neoxanthins, gemessen in Hexan; durchbrochene Linie und

Absorptionsspektrum des Neoxanthin-Isomeren, gemessen in Hexan; durchgezogene Linie

4. Zone X_1 (Neoxanthin-Isomeres), gewonnen aus etioliierten
Avena-Keimlingen

Die von diesem Pigment in verschiedenen Lösungsmitteln gemessenen Maxima stimmen am besten mit den in der Literatur angegebenen von Taraxanthin und Violaxanthin überein. Bei der Salzsäureprobe (KARRER 1948) färbt sich die Zone X_1 sowie auch das Neoxanthin blau. Dies bedeutet, daß auch der Farbstoff X_1 ein Epoxid darstellt. Es kann sich daher nicht um Taraxanthin handeln.

Obwohl das spektrale Verhalten der Bande X_1 auf Violaxanthin hindeutet (Abb. 7), wird eine Identität durch die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten im Adsorptionschromatogramm ausgeschlossen.

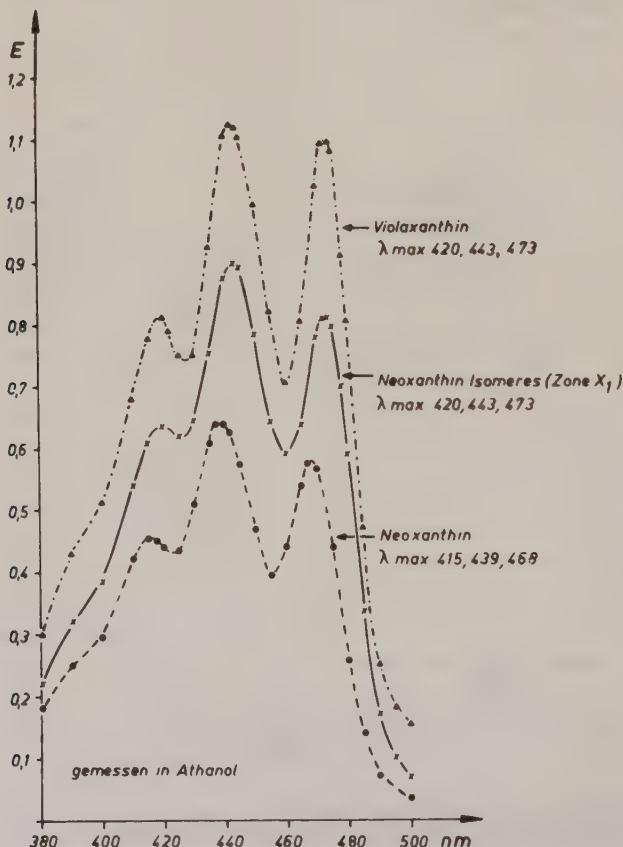


Abb. 7

Gegenüberstellung der Absorptionsspektren von Violaxanthin, Neoxanthin-Isomeres und Neoxanthin, in Äthanol gemessen.

Um zu entscheiden, ob mit der Zone X_1 ein cis-trans-Isomeres des Neoxanthin isoliert worden ist, werden Neoxanthin und die Zone X_1 durch Jod (PEACH-TRACEY 1955 Bd. III) isomerisiert. Jod bewirkt eine Stereoisomerisierung der Carotinoide (ZECHMEISTER 1962). Es werden sowohl die Carotinoide mit durchgehender trans-Konfiguration als auch die Carotinoide mit durchgehender cis-Konfiguration in mehrere cis-trans-Isomere umgelagert. Wenn es sich also bei der Zone X_1 um ein solches cis-trans-Isomeres des Neoxanthin handelt, müßten nach Behandlung mit Jod Neoxanthin wie auch X_1 im Chromatogramm in die gleichen Zonen aufspalten, da zu erwarten ist, daß Stereoisomere bei Jodeinwirkung gleiche Produkte liefern. Dieses ist, wie aus Abb. 8 ersichtlich, der Fall. Da zusätzlich zwischen der Zone X_1 und dem aus Neoxanthin gebildeten Isomeren eine spektrale Identität besteht, handelt es sich beim Farbstoff X_1 wahrscheinlich um ein cis-trans-Isomeres des Neoxanthin.

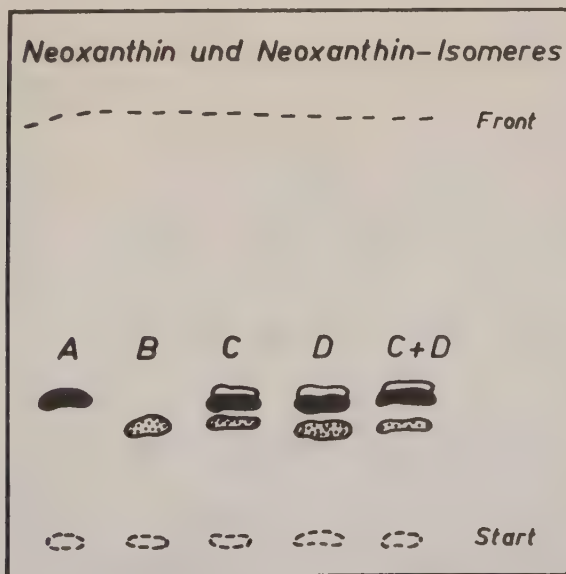
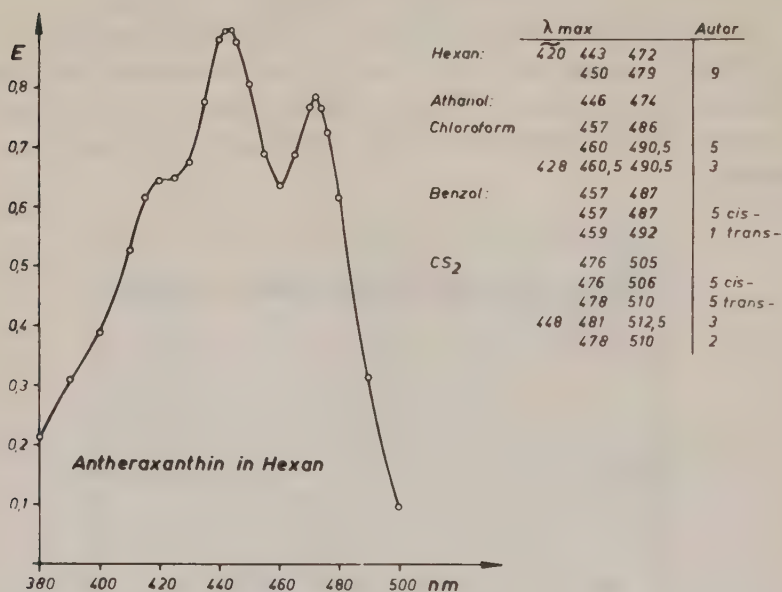


Abb. 8
Vergleichschromatogramm von mit Jod behandeltem Neoxanthin und Neoxanthin-Isomeren (Zone X_1)
A. Neoxanthin-Isomeres
B. Neoxanthin
C. Neoxanthin-Isomeres mit Jod
D. Neoxanthin mit Jod

Die denkbare Möglichkeit einer Entstehung des Farbstoffes X_1 während des Trennprozesses ist auszuschließen, da chromatographisch einheitliches Neoxanthin kein X_1 abspaltet. Gegen das Vorliegen eines Artefaktes sprechen ferner spätere Versuche, bei denen beobachtet wurde, daß je nach Belichtungszeit das Neoxanthin-Isomere in unterschiedlichen Mengen auftritt.

5. Antheraxanthin = Zeaxanthin-5,6-epoxid, gewonnen aus etiolierten Avena-Keimlingen (Abb. 9)



Da bei der Verteilungschromatographie Lutein und Zeaxanthin, die sich nur durch die Lage einer Doppelbindung in einem der beiden Iononringe unterscheiden, gemeinsam wandern, ist zu prüfen, ob ihre Epoxide sich ebenso verhalten. Aus diesem Grunde wird die auf verteilungschromatographischem Wege isolierte Bande 3 (Abb. 1) an der basischen Adsorptionsschicht rechromatographiert. Sie spaltet sich in zwei Zonen auf, von denen die stärkere als das hier beschriebene Zeaxanthin-5,6-epoxid identifiziert wird, während

die andere sehr schwache im Vergleichschromatogramm oberhalb vom Violaxanthin wandert (Abb. 3b, Bande 8) und als Lutein-5,6-epoxid unter VIII beschrieben wird. In der Literatur ist über eine Trennung von Lutein-5,6-epoxid und Antheraxanthin noch nicht berichtet worden. Da die spektralen Daten in den meisten Fällen aus Gemischen beider Pigmente gewonnen worden sein werden, versteht sich die Abweichung der hier gemessenen Maxima-Wellenlängen.

Für die Entscheidung der Frage, ob es sich um ein Carotinoid mit α - oder β -Iononring handelt, ist die Ausbildung des kurzwelligsten der drei Maxima ein wichtiges Kriterium (CHOLNOKY 1963). Während bei den Carotinoiden mit einem α -Iononring dieses Maximum gut ausgebildet ist, zeigen die Carotinoide mit β -Iononringen lediglich eine mehr oder weniger starke Flexur an Stelle dieses dritten Maximums. Wie aus dem Spektrum (Abb. 9) ersichtlich wird, handelt es sich in diesem Falle um ein Xanthophyll mit zwei β -Iononringen, also das Zeaxanthin-5,6-epoxid.

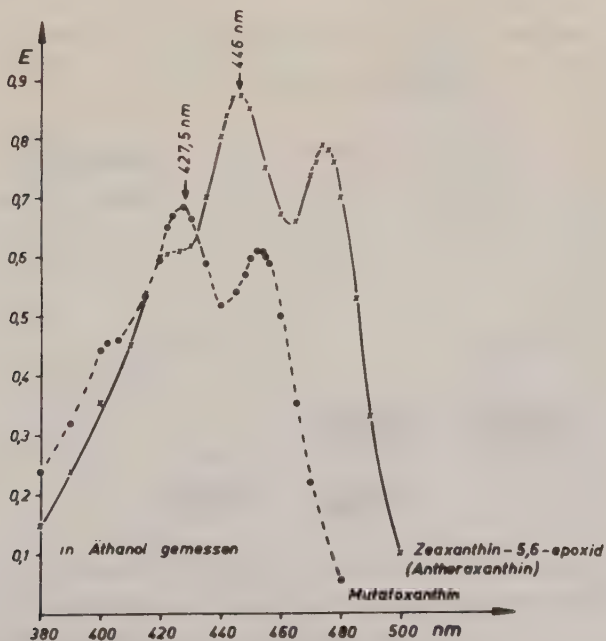


Abb. 10

Isomerisierung von Zeaxanthin-5,6-epoxid mit 0,01 n HCl in Chloroform. Durchgezogene Linie Zeaxanthin-5,6-epoxid, durchbrochene Linie das daraus entstandene furanoide Oxid Mutatoxanthin

Zur weiteren Identifizierung wird das Pigment mit HCl-haltigem Chloroform versetzt und dann erneut chromatographiert, nachdem die Blaufärbung den vollzogenen Übergang des Epoxids in die furanoide Form angezeigt hat, was mit einer Verschiebung der Maxima um 21 ± 4 nm verbunden ist (KARRER-JUCKER 1948). In diesem Fall müßte also aus dem Zeaxanthin-5,6-epoxid das vor allem in Blütenblättern vorkommende Mutatoxanthin entstanden sein. Chromatographiert man HCl-behandeltes Zeaxanthin-5,6-epoxid auf basischen Adsorptionsschichten, so entwickeln sich zwar mehrere Zonen, doch ist die quantitativ stärkste von ihnen, die am langsamsten wandert, in ihren Maxima denen des erwarteten Mutatoxanthins gleich (Abb. 10).

Bei der Adsorptionschromatographie von Extrakten aus *Euglena gracilis* fanden KRINSKY und GOLDSMITH (1960) eine Bande, die sie als Antheraxanthin ansprachen.

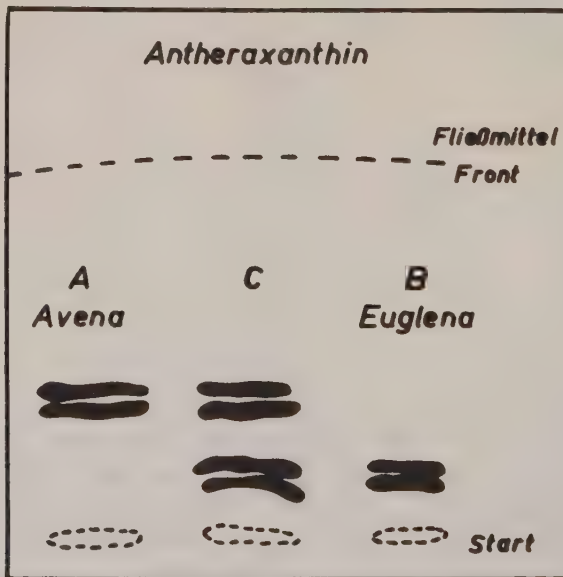
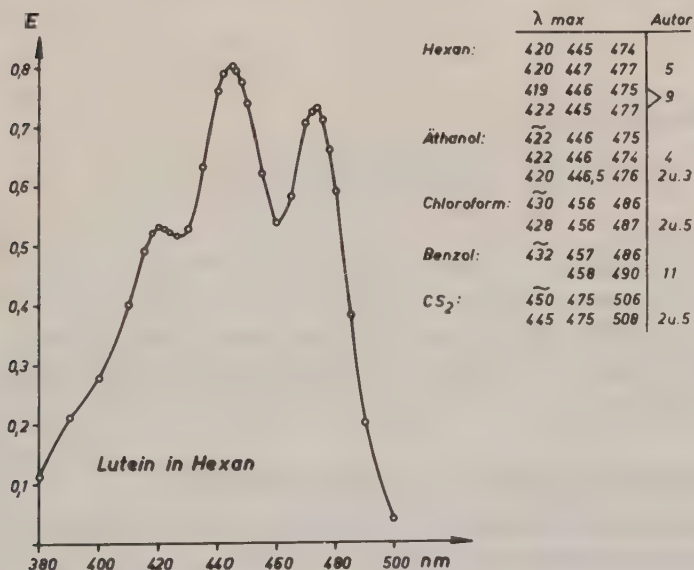


Abb. 11
Vergleichschromatogramm von mit Jod behandeltem Antheraxanthin
A. aus *Avena sativa* isoliert
B. aus *Euglena gracilis* isoliert
C. Mischchromatogramm aus A und B

Im Mischchromatogramm wandert es jedoch langsamer als das hier beschriebene Antheraxanthin. Beide Pigmente spalten bei der Behandlung mit Jod in je zwei Banden, die in ihrem chromatographischen Verhalten erheblich verschieden sind (Abb. 11). Es kann sich hier also nicht um cis-trans-Isomere handeln.

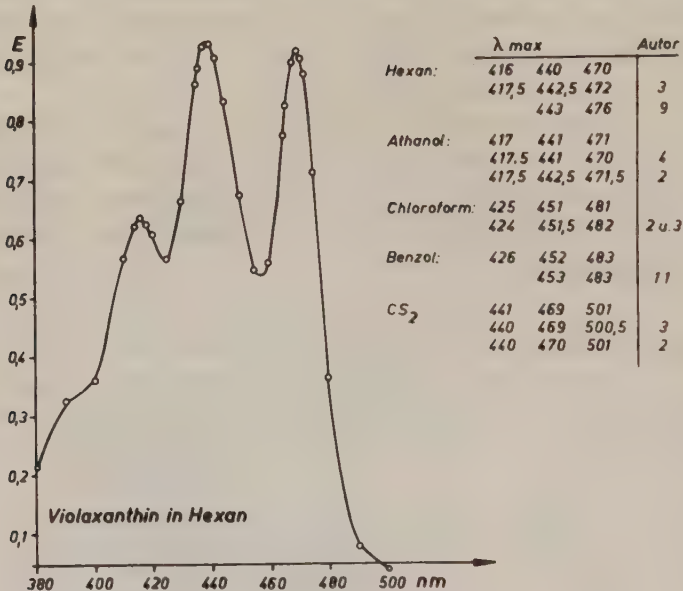
Eine weitere Isomerie-Möglichkeit, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht experimentell geprüft werden konnte, besteht in einer Verschiebung der OH-Gruppe vom C-Atom 3 zum C-Atom 4, wie sie von GROB und PFLUGSHAUPT (1962) für Zeaxanthin und Isozeaxanthin beschrieben wird.

6. Lutein, gewonnen aus etioliierten Avena-Keimlingen (Abb. 12)



Die Zuordnung des Luteins aufgrund seiner spektralen Daten ist eindeutig. Es stellt in den weitaus meisten Fällen den größten Anteil an Plastiden-Xanthophyllen.

7. Violaxanthin, gewonnen aus etiolierten Avena-Keimlingen (Abb. 13)



Seine Identifizierung ist zweifelsfrei möglich durch sein Spektrum und die Verschiebung seiner Maxima um 43 ± 4 nm (KARRER-JUCKER 1948) unter HCl-Einwirkung, womit das Vorliegen eines Di-epoxides bewiesen ist.

8. Lutein-5,6-epoxid, gewonnen aus Elodea canadensis

Da Lutein-5,6-epoxid in etiolierten und auch in normal ergrüntem Avena-Keimlingen nur in Spuren vorkommt, wird Elodea canadensis, aus welcher KARRER (1948) das Pigment isolierte, untersucht. Es wird auch hier ein nur geringer Gehalt an Lutein-epoxid festgestellt. Es wird zunächst gemeinsam mit Zeaxanthin-5,6-epoxid auf verteilungschromatographischem Wege gewonnen und dann von diesem auf der Adsorptionsschicht getrennt. Sein Spektrum ist in Abb. 14 dargestellt und zeigt ein deutlich ausgeprägtes kurzwelliges Maximum, das auf einen α -Iononring schließen

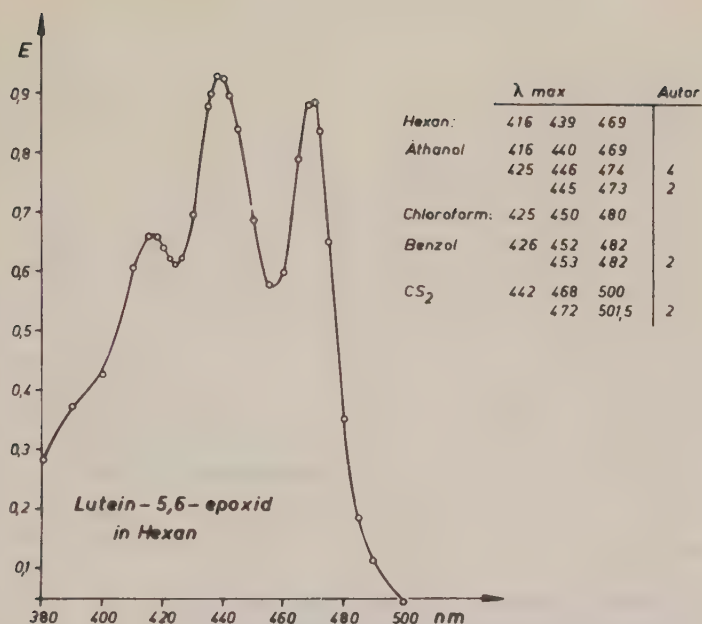


Abb. 14

Absorptionsspektrum des Lutein-5,6-epoxids, gemessen in Hexan

läßt (vergl. Kap. V). Da bisher offensichtlich nur Gemische von Lutein- und Zeaxanthin-5,6-epoxid beschrieben worden sind, gilt das bei der Diskussion des Zeaxanthin-5,6-epoxids Gesagte hier entsprechend.

Durch die Behandlung mit HCl-haltigem Chloroform und anschließender Chromatographie erhält man auch hier wieder wie bei Zeaxanthin-5,6-epoxid das furanoide Oxid, dessen Maxima um 21 nm in den kurzwelligen Bereich verschoben sind und mit denen des Flavoxanthins übereinstimmen (Abb. 15). Da die spektralen Daten des Lutein-5,6-epoxids den in der Literatur für Violaxanthin angegebenen ähnlich sind und es auch auf der basischen Dünnschichtplatte in der Nähe des Violaxanthins wandert, war zu prüfen, ob hier ein Isomeres des Violaxanthins vorliegt. In diesem Fall würden beide Epoxide bei HCl-Einwirkung pro Molekül zwei furanoide Ringe ausbilden, was mit einer Verschiebung der Maxima um 2×21 nm

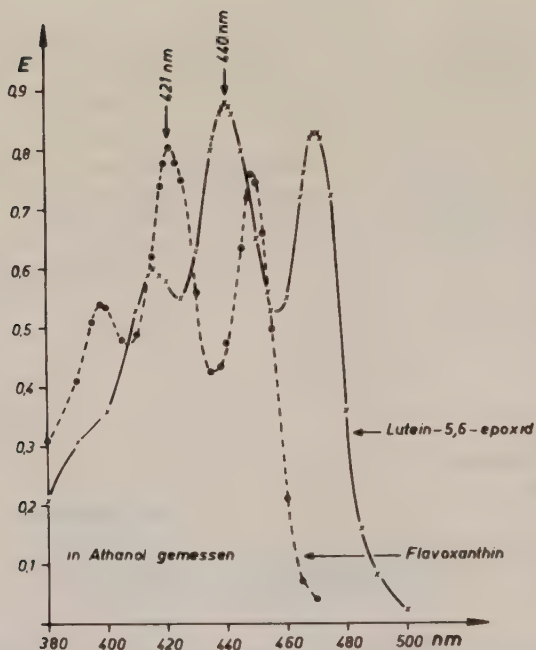


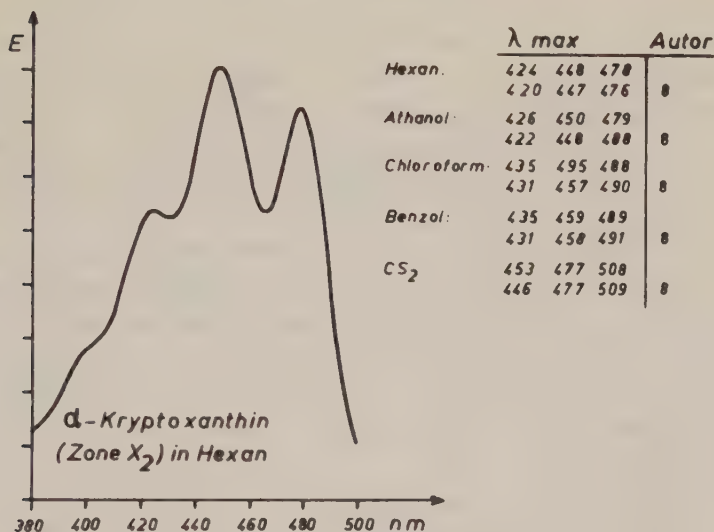
Abb. 15

Isomerisierung von Lutein-5,6-epoxid mit 0,01 n HCl in Chloroform. Durchgezogene Linie Lutein-5,6-epoxid, durchbrochene Linie das daraus entstandene furanoide Oxid Flavoxanthin

verbunden wäre (KARRER-JUCKER 1948). Zwar entstehen bei der Chromatographie des mit HCl behandelten Lutein-5,6-epoxids mehrere Zonen, keine von ihnen zeigt jedoch eine starke Verschiebung der Maxima, so daß ein Violaxanthin-Isomeres ausscheidet. Das furanoide Oxid (Flavoxanthin) war entsprechend den für das Mutatoxanthin beschriebenen Befunden auch hier wieder die stärkste unterste Zone.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die bisher meist als Lutein-5,6-epoxid beschriebene Zone in Chloroplastenchromatogrammen zum größten Teil aus Zeaxanthin-5,6-epoxid besteht, das mit Spuren von Lutein-5,6-epoxid vermischt ist.

9. Zone X_2 (a-Kryptoxanthin), gewonnen aus Blättern von *Veratrum album* (Abb. 16)



Dieses Pigment wurde in Spuren bei *Chlorella pyrenoidosa* beobachtet; einen größeren Gehalt haben die herbstlich gelben Blätter von *Veratrum album*. Der Farbstoff X_2 wird bei der Verteilungschromatographie von Chlorophyll a überdeckt und kann daher erst mit Hilfe der adsorptionschromatographischen Methode isoliert werden.

Die Salzsäureprobe verläuft negativ, es liegt demnach kein Epoxid vor. Das Pigment X_2 zeigt im Spektrum ein ausgeprägtes kurzwelliges drittes Maximum, so daß es sich offensichtlich um ein Carotinoid mit einem a-Iononring handelt (CHOLNOKY 1963). Da die Lage der Maxima mit den für a-Kryptoxanthin in der Literatur angegebenen am besten übereinstimmen, wird angenommen, daß es sich bei dem hier beschriebenen Pigment um a-Kryptoxanthin handelt (CHOLNOKY 1958).

10. Zone X_3 (a-Carotin-mono-epoxid), gewonnen aus Blättern von *Veratrum album*

Auch dieses Pigment wird in Spuren bei *Chlorella pyrenoidosa* beobachtet, für unsere Versuche jedoch aus *Veratrum album* isoliert. Im Verteilungschromatogramm wird es von Chlorophyll b über-

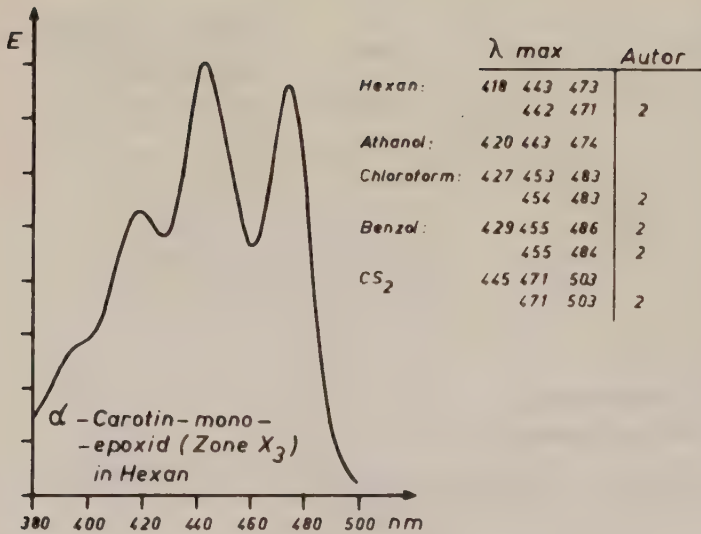


Abb. 17

Absorptionsspektrum des α -Carotin-mono-epoxids (Zone X₃), gemessen in Hexan

deckt und daher adsorptionschromatographisch gewonnen. Die positiv verlaufende Salzsäureprobe und das spektrale Verhalten machen es wahrscheinlich, daß mit dem Pigment X₃ das α -Carotin-mono-epoxid isoliert worden ist.

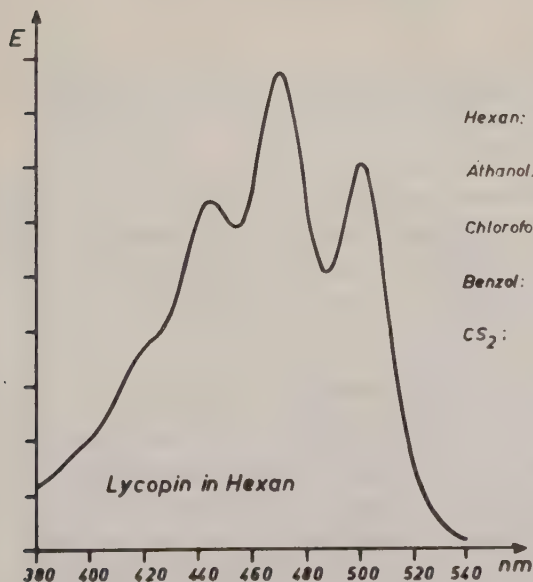
11. Carotinbände

Die in der Abb. 1 mit 7 bzw Abb. 3b mit 9 bezeichnete Bande stellt je nach Herkunft des Extraktes in vielen Fällen ein Gemisch aus α - und β -Carotin dar und trennt sich bei verändertem Lösungsmittelgemisch weiter auf (s. Experimentelles). Avena lieferte in unseren Versuchen stets schon im ersten Chromatogramm eine einheitliche β -Carotin-Bande.

B. Carotine

Da es von Wichtigkeit war, auf den neuen Dünnschichtplatten die relative Lage der Carotine zu kennen, wurden auch solche Carotine mit untersucht, welche in normal grünen Blättern nicht oder nur in Spuren vorkommen. Bei der Verteilungsprobe zwischen Petroläther und 90 %igem Methanol verhalten sich nachfolgend beschriebene Carotine rein epiphasisch, was den Schluß zuläßt, daß es sich hier um reine Kohlenwasserstoffe handelt. Während sie auf der verteilungschromatographischen Dünnschichtplatte gemeinsam an der Front laufen, lassen sie sich an der adsorptionschromatographischen Dünnschichtplatte mit Benzin, dem etwas Aceton zugesetzt ist (100 : 3), trennen (Abb. 3b). Hierbei verbleiben die Xanthophylle am Start.

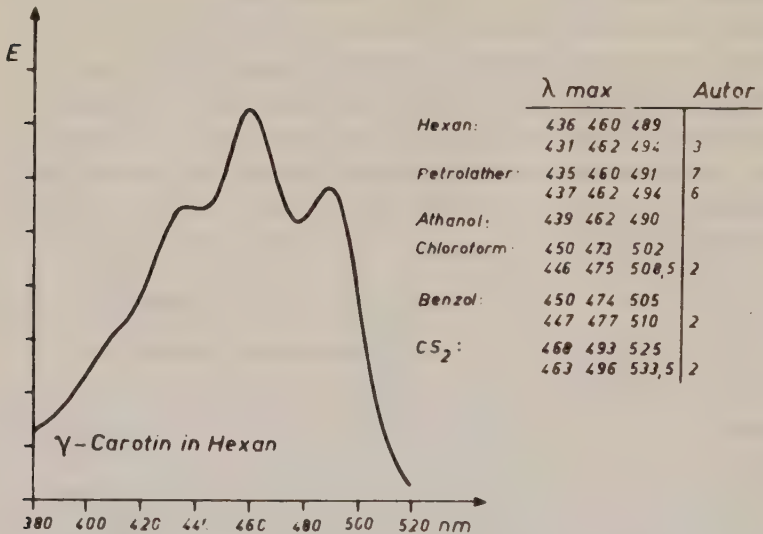
1. Lycopin, gewonnen aus *Solanum lycopersicum* (Abb. 18)



	λ_{max}			Autor
Hexan:	444	470	500	11
	445	472	505	
Äthanol:	448	471	500	2
	443	472	503	
Chloroform:	455	483	515	3 u 2
	453	480	517	
Benzol:	456	484	517	2
	455	487	522	
CS ₂ :	476	505	542	2 u 3
	477	507,5	548	

Lycopin ist das Hauptpigment reifer Tomaten (90 % der Gesamtcarotinoide). Es zeigt bei der Trennung an der Adsorptionsschicht eine nur geringe Laufstrecke (Abb. 3a, Bande 1) und kann mit Chloroform quantitativ eluiert werden.

2. γ -Carotin, gewonnen aus *Daucus carota* (Abb. 19)



Sein Vorkommen in höheren Pflanzen ist sehr selten. Es tritt immer nur in Spuren als Begleiter des β -Carotins auf. Es wird weniger fest als Lycopin adsorbiert (Abb. 3a, Bande 2) und wird am besten auch durch Chloroform eluiert.

3. ξ -Carotin, gewonnen aus *Daucus carota* (Abb. 20)

Es ist ein 7,8, 7',8'-Tetrahydrolycopin und absorbiert von allen bekannten Carotinen am weitesten im kurzwelligen Spektralbereich. Sein Vorkommen ist sehr selten. VILLOUTREIX (1960) isolierte es aus dem Bakterium *Chromatium okenii* und SCHMIDT (1963) aus dem Bakterium *Rhodotorula mucilagenosa*. In höheren Pflanzen ist es noch nicht beschrieben worden.

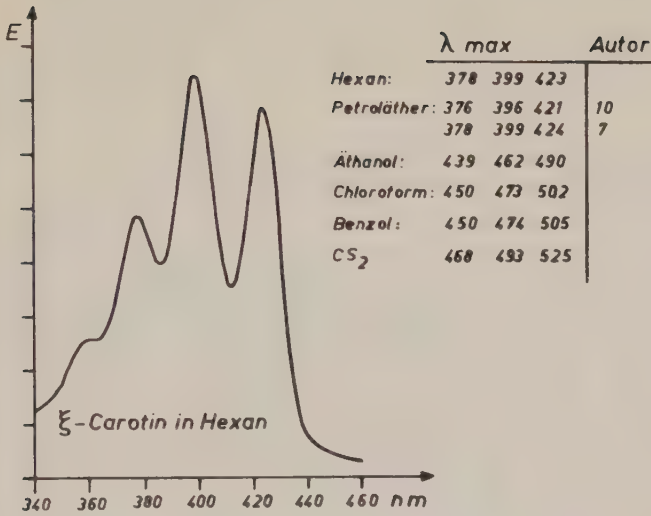
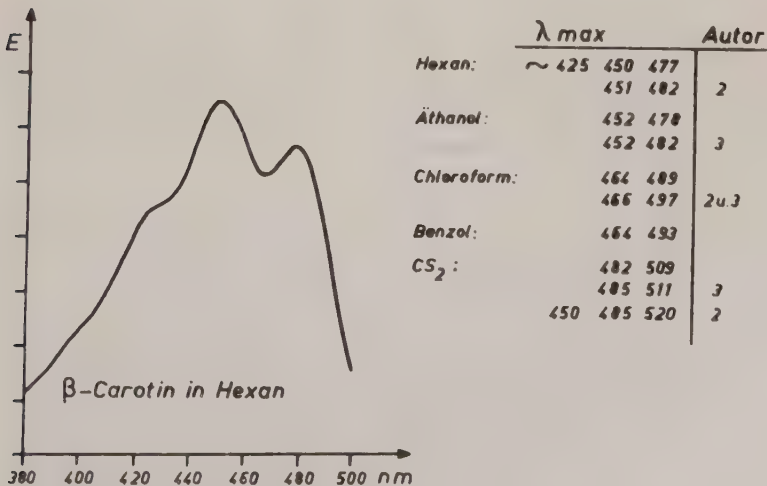


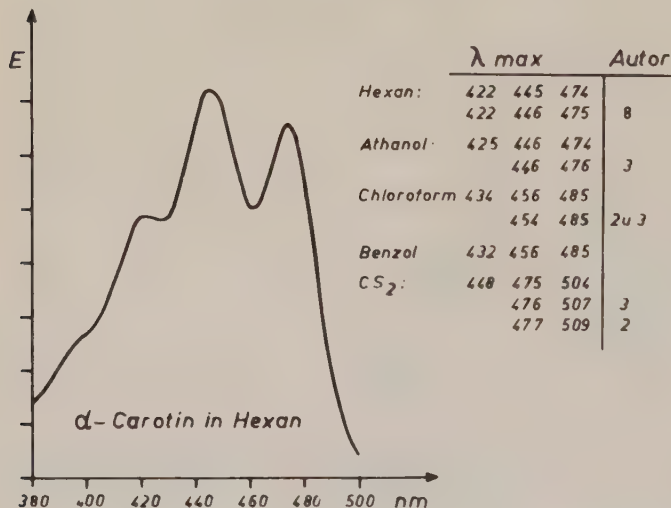
Abb. 20
ξ-Carotin, gewonnen aus *Daucus carota*

4. β-Carotin, gewonnen aus *Daucus carota* (Abb. 21)



Es ist das am weitesten verbreitete und bekannteste Carotin. Aus Karotten kann es in großen Mengen gewonnen werden; hier macht es ungefähr 60 % des Gesamtcarotiningehalts aus, während es in normal grünen Blättern nur zu etwa 20 % vorkommt.

5. α -Carotin, gewonnen aus *Daucus carota* (Abb. 22)



Es ist in der Natur weit verbreitet. Während es in den grünen Teilen höherer Pflanzen nur in Spuren vorkommt, tritt es bei den Algen in großen Mengen auf.

IV. Untersuchungen klimatisch und genetisch bedingter Pigment-
=====

veränderungen an *Veratrum album* und *Thuja occidentalis*
=====

A. *Veratrum album*

Die Untersuchungen schließen an frühere Arbeiten HAGER's (1957) an, der in stark belichteten Blatteilen eine Abnahme der grünen Farbstoffe unter gleichzeitiger Zunahme bestimmter Xanthophylle festgestellt hatte. Diese Befunde sind bestätigt worden, wie aus der nachstehenden Tabelle hervorgeht. Aus der weiteren Aufschlüsselung der Xanthophylle ergibt sich, daß Violaxanthin an der Xanthophyllzunahme nicht beteiligt ist.

Tabelle 1: Vergleich der Pigmentmengen sonnenzu- und -abgewandter Blatteile von *Veratrum album* und *Thuja occidentalis*

	<i>Veratrum</i>		<i>Thuja "normal"</i>		<i>Thuja "lutea"</i>	
	Schatten	Sonne	Schatten	Sonne	Schatten	Sonne
	%	%	%	%	%	%
Chlorophyll a	100	46	100	44	100	46
Chlorophyll b	100	35	100	33	100	20
Carotin	100	68	100	61	100	68
Lutein und Zeaxanthin	100	106	100	127	100	116
Antheraxanthin	100	127	100	174	100	200
Violaxanthin	100	78	100	61	100	42
Neoxanthin	100	48	100	50	100	44

B. *Thuja occidentalis*

Bei *Thuja* interessierte die Pigmentverteilung der "photolabilen" im Vergleich zu den "photostabilen" Varianten. Es konnte gezeigt werden, daß die Carotinoide in den photolabilen Formen untereinander im gleichen Verhältnis stehen wie in normalen Exemplaren; ihr Pigmentgehalt ist jedoch vermindert (Tab. 2). Für die

Unterschiede zwischen den Licht- und Schattenseiten gilt das bei *Veratrum* Gesagte (Tab. 1).

Tabelle 2: Vergleich des prozentualen Anteils der einzelnen Pigmente an der Gesamtpigmentmenge sonnenzu- und sonnenabgewandten Blatteilen von *Veratrum album* und *Thuja occidentalis*

	Veratrum				Thuja "normal"				Thuja "lutea"			
	Schatten		Sonne		Schatten		Sonne		Schatten		Sonne	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
Chlorophyll a	73,5	56	34	50	230	59	102	55	175	67	81	67
Chlorophyll b	31	24	10,7	16	105,5	27	34,1	18	51,5	20	10,2	8
Carotin	5,3	4	3,6	5	14,3	4	8,8	5	10,1	4	6,9	6
Lutein und Zeaxanthin	12,3	10	13	19	20,4	5	26	14	13,6	5	15,7	13
Antheraxanthin	1,6	1	2	3	1,9	0,5	3,3	2	1,3	0,5	2,6	2
Violaxanthin	4,4	3	3,5	5	11,6	3	7,1	4	6,7	2,5	2,8	3
Neoxanthin	2,5	2	1,2	2	7,2	1,5	3,6	2	3,6	1	1,6	1
Gesamtmenge	130,6	100	68	100	390,9	100	184,9	100	261,8	100	120,8	100

V. Quantitative Veränderungen von Chloroplastenfarbstoffen etiolierter
Avena-Keimlinge unter dem Einfluß verschiedener Lichtfrequenzen,
verschiedener Temperaturen und den Hemmstoffen Streptomycin und
Diphenylamin

Ein Hauptanliegen aller Arbeiten über die Biogenese der Carotinoide ist die Frage, in welchem Maße verschiedene Carotinoide bei Belichtung ineinander umgewandelt oder neu gebildet werden und in welcher Beziehung sie zur Photosynthese stehen.

Als Versuchspflanzen wurden etiolierte Avena-Keimlinge gewählt, weil sie wegen des fehlenden Chlorophylls zunächst nicht zur Photosynthese befähigt sind und daher Aussagen über den Einfluß von Photosyntheseleistungen auf die Carotinoidgenese ermöglichen.

Die im folgenden beschriebenen Versuche zu diesem Problem werden in der Diskussion zusammen mit den Ergebnissen anderer Autoren einer kritischen Betrachtung unterzogen.

Bei der Deutung der Carotinoidveränderungen während der Belichtung der Versuchspflanzen mußte natürlich auch die Bildung des Chlorophylls und die damit verbundene Photosynthese und Chloroplastenentwicklung berücksichtigt werden. So beschreiben BLAAUW und JANSEN (1950) für die ersten acht Stunden Belichtungszeit eine Abhängigkeit der Photosyntheseleistung von der entstehenden Chlorophyllmenge und deuten einen Zusammenhang mit den Carotinoidveränderungen an. SHEN und HUNG (1963) berichten, daß bei Belichtung etiolierter Weizenkeimlinge die Photophosphorylierung erst nach zwei bis drei Stunden einsetzt und im Verlaufe der nächsten Stunden parallel zur Chlorophyllsynthese ansteigt. Auch ANDROES et al. (1963) beschreiben, daß während der frühen Stadien des Ergrünens die Photosyntheserate proportional der Chlorophyllkonzentration ist. Schließlich wurde auch noch die Chloroplastenentwicklung berücksichtigt, die nach VIRGIN (1963) in drei Schritte unterteilt wird. Der erste Schritt verläuft im Dunkeln, im zweiten werden bei Belichtung während zwei bis drei Stunden die Primäranlagen gebildet, die im dritten Schritt dann zu Grana umgeformt werden.

Diese Hinweise ließen die Begrenzung der Belichtungszeit auf acht Stunden und ihre Einteilung in zwei Abschnitte als zweckmäßig erscheinen: Während dieser acht Stunden kann die Chlorophyllmenge als Maßstab für die Photosyntheseleistung herangezogen werden (BLAAUW, JANSSEN 1950). Die Beeinflussung des Carotinoidgehaltes durch Licht während der ersten beiden Stunden unterliegt möglicherweise einem anderen Mechanismus als die später folgenden Veränderungen. Dieser Gesichtspunkt wird in der Diskussion näher erörtert werden.

Bei den Untersuchungen über die Mengenveränderungen der Carotinoide und Chlorophylle wurde die adsorptionschromatographische Methodik verwendet (vergl. Experimentelles), die zu methodisch exakt reproduzierbaren Ergebnissen geführt hat, so daß auftretende Schwankungen in der Pigmentkonzentration nur durch das Pflanzenmaterial verursacht sein können. Nicht nur die Verwendung verschiedener Arten führt zu unterschiedlichen Ergebnissen (KHODZHAYEO 1963), sondern auch das physiologische Alter von Versuchspflanzen einer Art beeinflußt den Versuchsablauf. So lassen acht bis neun Tage alte Avena-Keimlinge eine weitaus geringere Zunahme des Zeaxanthins in der ersten Belichtungsphase erkennen, als die in den hier beschriebenen Versuchen verwendeten ein bis zwei Tage jüngeren Keimlinge. Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sind daher stets Objekte genau gleichen Alters bei konstant gehaltenen Anzuchtbedingungen verwendet worden. Zur Begrenzung der stets vorhandenen individuellen Schwankungen in der Entwicklung von Keimlingen einer Aussaat sind außerdem nur Exemplare annähernd gleicher Länge in den Versuch genommen worden.

A. Lichtinduzierte Pigmentveränderungen

1. Weißlicht, 6000 Lux, 9900 erg/cm²sec (Abb. 23)

Wie schon andere Autoren (BLAAUW-JANSEN 1950) beobachtet haben, nimmt Chlorophyll a parallel zur Belichtung zu, Chlorophyll b dagegen erst nach ein bis zwei Stunden Belichtungszeit, einem Zeitintervall, das dem vorhergehend beschriebenen ersten Belichtungsabschnitt entspricht. Während dieser ersten Phase, zu einer Zeit also, in der noch keine meßbare Photosyntheseleistung stattfindet (SHEN und HUNG 1963), ist auch bei Violaxanthin, Lutein und Neoxanthin kein nennenswerter Unterschied zu den Dunkelwerten festzustellen. Ihre Konzentration erhöht sich erst in der zweiten Phase. Zeaxanthin jedoch steigt mit Einsetzen der Belichtung stark an und erreicht nach zwei Stunden den doppelten Dunkelwert, um dann während der zweiten Phase unter diesen abzusinken. Beim Antheraxanthin ist dieser Abfall in der zweiten Phase noch ausgeprägter; ihm ging eine geringfügige Steigerung in der ersten Phase voraus. β -Carotin wird mit Einsetzen der Belichtung vermehrt gebildet, besonders stark in der zweiten Belichtungsphase.

2. Starklicht, 50000 Lux, 93000 erg/cm²sec (Abb. 24)

Vom Starklicht unbeeinflusst bleiben die β -Carotin- und Neoxanthinmengen, die sich von den Dunkelwerten nicht unterscheiden. Sehr auffallend ist die starke Zunahme des Zeaxanthins in der ersten Belichtungsphase, in der sich Antheraxanthin, Violaxanthin und Lutein entgegengesetzt verhalten. In der zweiten Phase stellt sich bei allen Carotinoiden ein zu den Dunkelwerten annähernd paralleler Kurvenlauf ein, der in seinen Absolutwerten naturgemäß um die in der ersten Phase erfolgten Mengenänderungen verschoben ist.

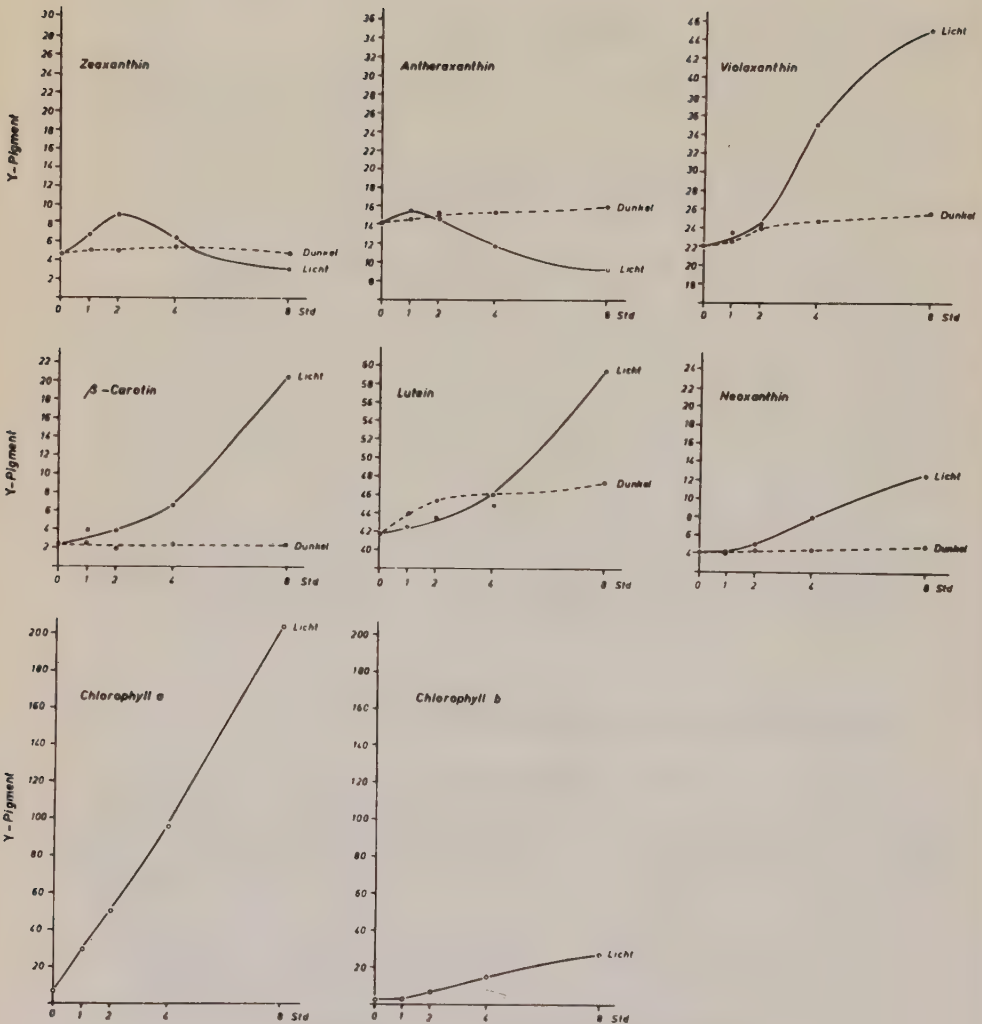


Abb. 23

Quantitative Veränderungen der Chloroplastenfarbstoffe von etiolierten Avena-Keimlingen während acht Stunden Belichtung mit Weißlicht bei 23°C (durchgezogene Linie). Kontrolle: acht Stunden im Dunkeln bei 23°C (durchbrochene Linie)

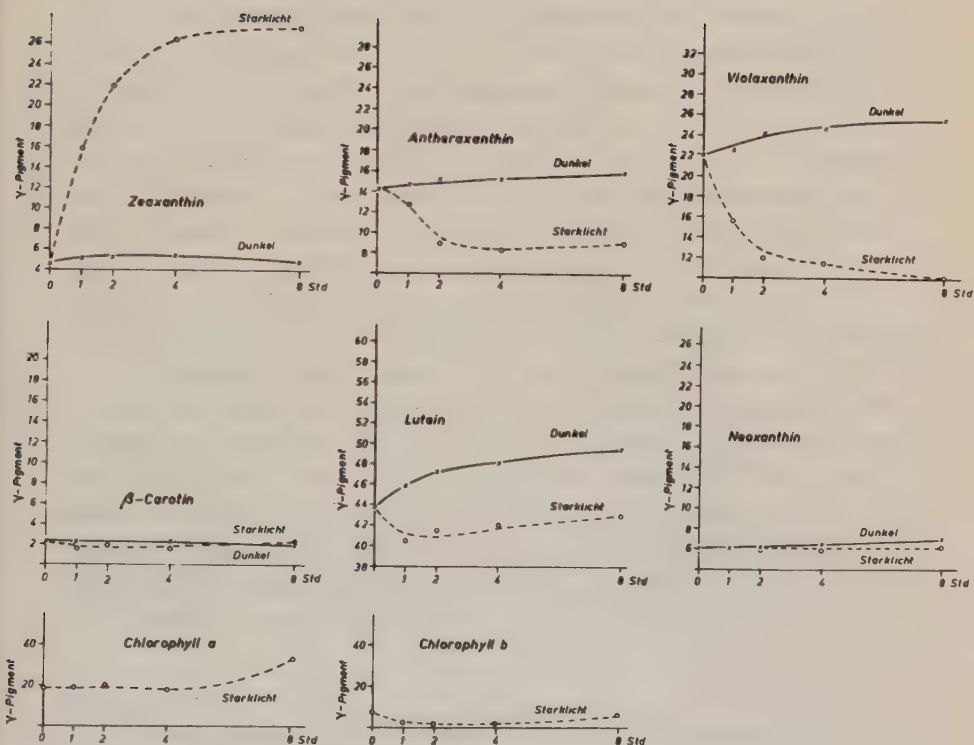


Abb. 24

Quantitative Veränderungen der Chloroplastenfarbstoffe etiolierter Avena-Keimlinge während acht Stunden Belichtung mit Starklicht (durchbrochene Linie)
Kontrolle: acht Stunden im Dunkeln (durchgezogene Linie)

3. Rotlicht, 3500 erg/cm²sec und Blaulicht, 2000 erg/cm²sec (Abb. 25)

Um festzustellen, ob der im Weißlicht beobachtete Anstieg des Zeaxanthins und der darauf folgende Abfall durch eine Lichtfrequenz verursacht wird, welche die Carotinoide selbst absorbieren, ist in den folgenden Versuchen die Wirkung des Rot- und Blauanteils des Weißlichtes untersucht worden. Wirkt das Licht direkt auf die Carotinoide und ist ihre quantitative und qualitative Veränderung eine Folge dieser Absorption, so müssen im Blaulicht die gleichen Veränderungen wie im Weißlicht auftreten, Rotlicht dagegen darf keine Veränderungen hervorrufen.

Aus dem erhaltenen Diagramm (Abb. 25) wird deutlich, daß sowohl bei Rotlicht als auch bei Blaulicht im Vergleich zu Weißlicht vermindert Pigmente gebildet werden. Einen Unterschied in der Rot- und Blaulichtwirkung findet man beim Zeaxanthin. Während sich Rotlicht wie Weißlicht verhält, in der ersten Belichtungsphase also eine Zunahme und in der zweiten Phase eine Abnahme bewirkt, läßt Blaulicht die Konzentration auch in der ersten Phase unter die Dunkelwerte sinken. Daraus ergibt sich, daß die auffällige Zeaxanthinzunahme in der ersten Belichtungsphase nicht durch eine direkte Lichtabsorption der Carotinoide bewirkt werden kann.

B. Diphenylamin- (DPA) Einfluß auf die Pigmentveränderungen (Abb. 26)

Um zu entscheiden, ob die Zunahme des Zeaxanthins in der ersten Belichtungsphase durch eine Neusynthese (GOODWIN 1958) oder durch eine Umwandlung schon vorhandener Xanthophylle untereinander (BLAAUW-JANSEN et al. 1950) bedingt ist, sollte versucht werden, durch DPA die Bildung der Carotinoide aus den Vorstufen (GOODWIN 1961) zu hemmen. Die gewonnenen Ergebnisse können aber nur geringen Aussagewert beanspruchen, da das DPA nur sehr schlecht von den Keimlingen aufgenommen wird und außerdem bei grünen Zellen leicht Schädigungen hervorrufft (METZNER und SENGER 1962). Nach acht Stunden DPA-Dunkelinkubation wird in den Dunkelkontrollen ein vermehrter Carotinoidgehalt festgestellt. Ausgehend von diesen Dunkelwerten kann durch Belichtung keiner der früher beobachteten

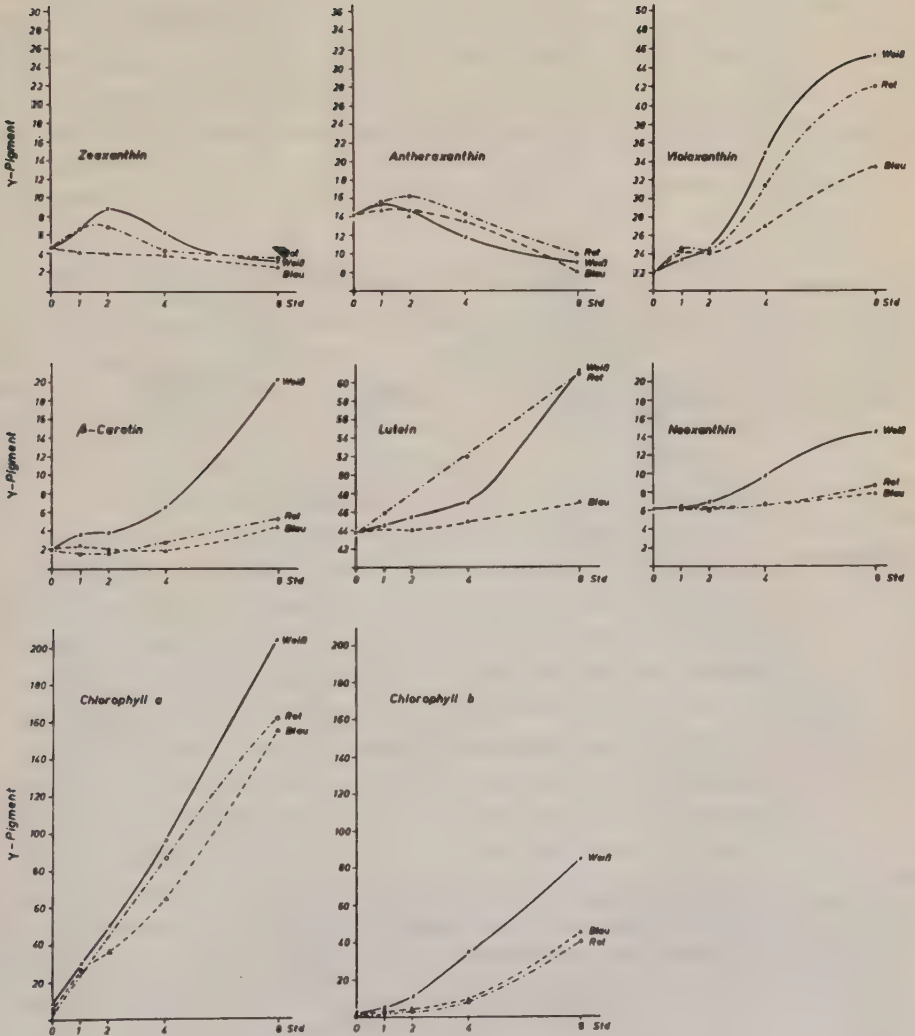


Abb. 25

Quantitative Veränderungen der Chloroplastenfarbstoffe etio-
lierter Avena-Keimlinge während acht Stunden Belichtung mit
R o t l i c h t (Strich-Punkt-Linie) und B l a u l i c h t
(durchbrochene Linie) bei 25°C.

Kontrolle: Weißlicht (durchgezogene Linie)

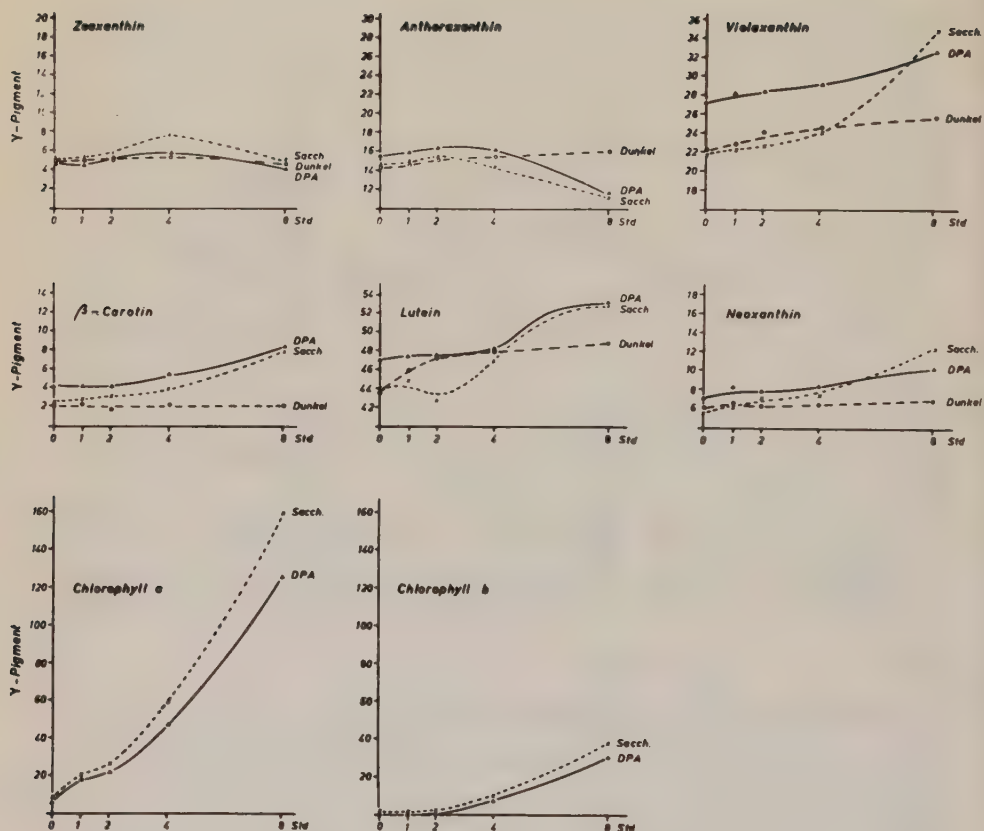


Abb. 26

Quantitative Veränderungen der Chloroplastenfarbstoffe etiolierter Avena-Keimlinge während acht Stunden Belichtung mit Weißlicht bei 23°C nach vorausgegangener achtstündiger Dunkelinkubation mit 10^{-4}m Diphenylamin (DPA) in 10^{-2}m Saccharoselösung bei 23°C (durchgezogene Linie). Kontrolle: achtstündige Dunkelinkubation mit 10^{-2}m Saccharoselösung allein (punktirierte Linie) und acht Stunden im Dunkeln in aqua dest. ohne anschließende Belichtung (durchbrochene Linie).

Effekte erreicht werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die nicht mit DPA behandelten Pflanzen im Licht schon einen verzögerten Anstieg des Zeaxanthins zeigen, was mit einer Verarmung der Gewebestückchen während der langen Versuchsdauer erklärt werden könnte. Sollte eine zusätzliche DPA-Vergiftung darüberhinaus zu einem Zusammenbruch wichtiger Stoffwechselprozesse geführt haben, so läßt sich eine Hemmung der Carotinoidsynthese nicht mehr analysieren.

C. Streptomycineinfluß auf die Pigmentveränderungen (Abb. 27)

Da Streptomycin die Chloroplastenausbildung und Chlorophyllbildung hemmt (GOODWIN 1959; METZNER und SENGEL 1961; MEGO 1964), ermöglicht seine Anwendung eine Beobachtung von lichtbedingten Veränderungen des Carotinoidgehalts unter Ausschluß der an die Chloroplastendifferenzierung gebundenen Synthesen.

Während der achtstündigen Dunkelinkubation mit Streptomycin sinken die Violaxanthin- und Luteinkonzentrationen stark ab; die Mengen der anderen Pigmente bleiben unverändert. Bei anschließender Belichtung verhalten sich Lutein und Neoxanthin wie ihre Kontrollen ohne Streptomycin, bei den anderen Carotinoiden ist ein Streptomycineinfluß besonders im zweiten Belichtungsabschnitt feststellbar: Die β -Carotin-, Antheraxanthin- und Violaxanthinkonzentrationen verlaufen ähnlich wie die Dunkelwerte, d.h. der Lichteinfluß wird aufgehoben; die Zeaxanthinmengen dagegen steigen stetig an, d.h. der Lichteinfluß wird in diesem Fall verstärkt. Der unter Normalbedingung in der zweiten Belichtungsphase einsetzende Zeaxanthinabfall (keine Streptomycininkubation) muß daher mit Photosynthese- bzw. Enzymleistungen, die an die Differenzierung der Chloroplasten gebunden sind, in ursächlichem Zusammenhang stehen. Eine Aussage über Enzymbeteiligungen wird durch die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit möglich, die sich anschließt.

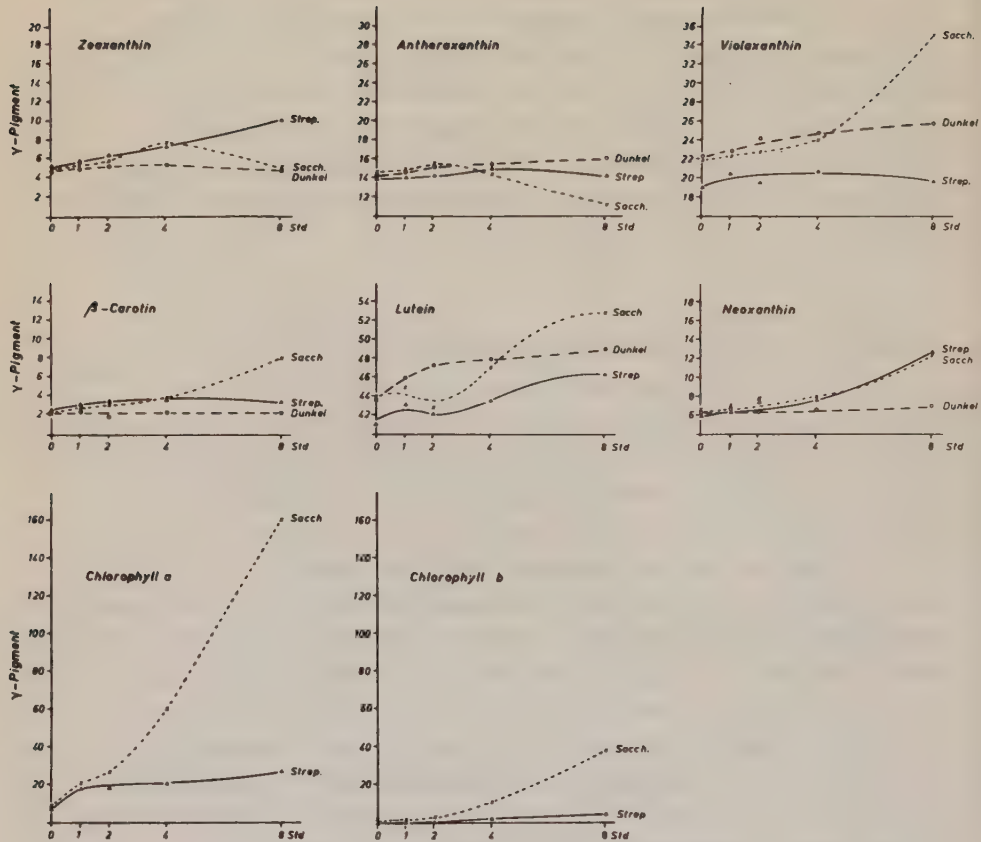


Abb. 27

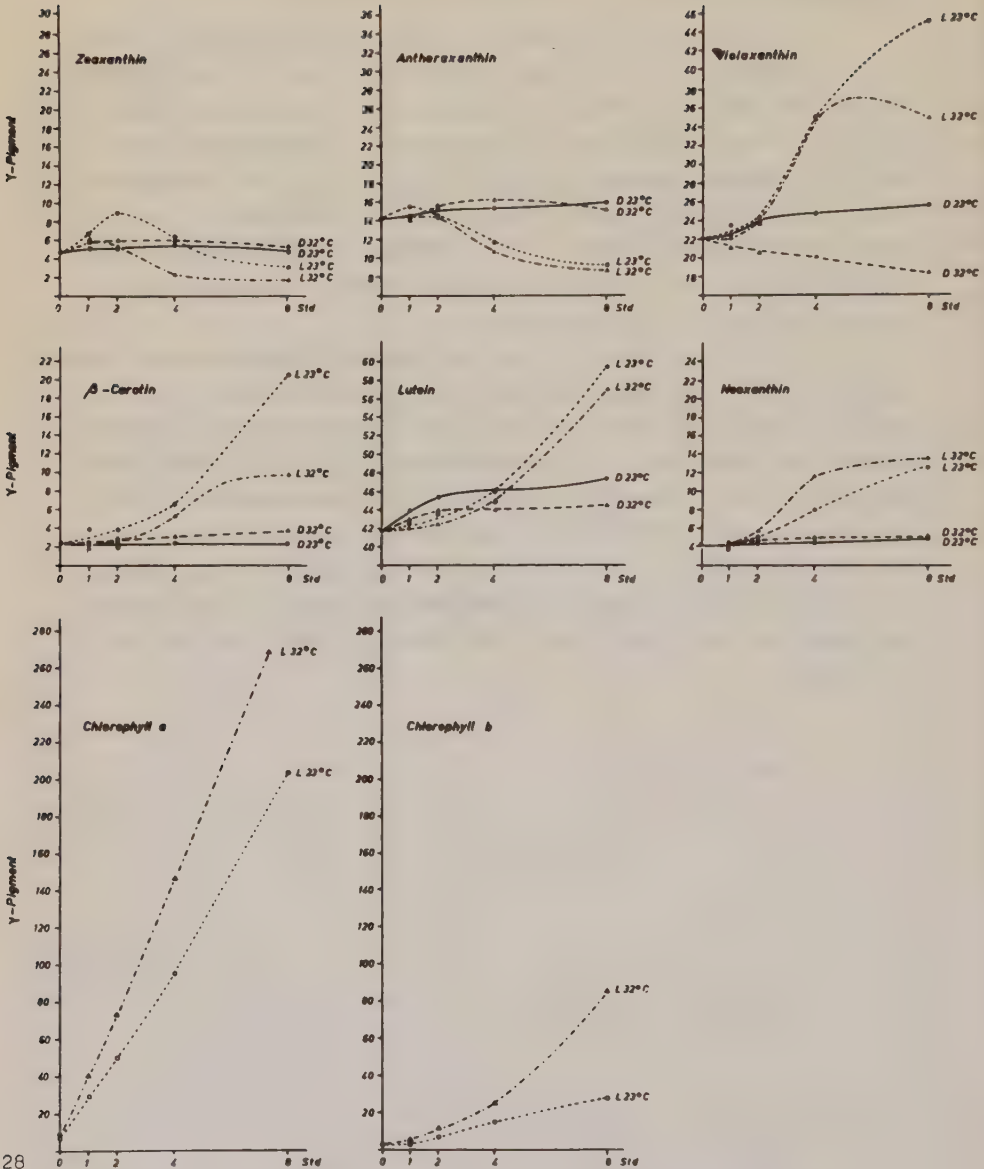
Legende siehe Abb. 26

Statt DPA wurde 10^{-3} M Streptomycinlösung verwendet.

D. Temperatureinfluß auf die Pigmentveränderungen (Abb. 28)

Da es denkbar ist, daß die Pigmentveränderungen im Starklicht auch durch eine Erwärmung des Versuchsmaterials hervorgerufen worden sein könnten, wurde der Einfluß einer Temperaturerhöhung bei gleichbleibender Lichtintensität untersucht. Im Weißlicht bewirkt eine Erhöhung der Temperatur von 23° C auf 32° C eine stärkere Synthese sowohl von Chlorophyll a als auch von Chlorophyll b. Da, wie früher beschrieben, im gewählten Versuchszeitraum Chlorophyllbildung und Photosyntheseleistung parallel laufen, resultiert hier eine Steigerung der Photosynthese.

Bei den Carotinoiden bewirkt eine Temperaturerhöhung schon im Dunkeln eine β -Carotin-Zunahme, während Violaxanthin und Lutein gegenüber den 23° C-Werten abnehmen. Die Temperaturerhöhung bei Belichtung mit Weißlicht hat in den meisten Fällen eine verringerte Carotinoidsynthese zur Folge: Zeaxanthin und Antheraxanthin werden vor allem in der ersten Belichtungsphase weniger gebildet, β -Carotin, Violaxanthin und Lutein in der zweiten Phase. Nur die Neoxanthinbildung steigt zwischen der zweiten und vierten Stunde Belichtung schneller an, normalisiert sich aber bis zum Ablauf der zweiten Phase.



28

Quantitative Veränderungen der Chloroplastenfarbstoffe etiolierter Avena-Keimlinge während

1. acht Stunden Belichtung mit Weißlicht bei 32°C (Strich-Punkt-Linie) und zum Vergleich bei 23°C (punktierter Linie).
2. acht Stunden im Dunkeln bei 32°C (durchgezogene Linie) und zum Vergleich bei 23°C (durchbrochene Linie)

VI. Experimentelles =====

A. Versuchsmaterial

1. Veratrum album -----

Die gelben, der Sonne zugewandten Blattstreifen von *Veratrum album* (Botanischer Garten, München) wurden von den grünen Schattenstreifen getrennt (HAGER 1957) und vergleichend untersucht.

2. Thuja occidentalis -----

Von *Thuja occidentalis* (Botanischer Garten, München) wurden einjährige Sprossen jeweils von der Sonnen- und Schattenseite photostabiler und photolabiler Exemplare gesammelt und vergleichend untersucht.

3. Avena sativa -----

a. Anzucht

Mit Ceresan-Naßbeize vorbehandelter Hafer (Svalöfs Siegeshafer II) wurde in Aluminiumschalen auf feuchtem Sägemehl bei 23° C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit im dunkelen Brutschrank herangezogen. Die tägliche Bewässerung erfolgte bei Grünlicht, ebenso das Dekapitieren (3 mm) der Koleoptilen am fünften Tage, wodurch das Auswachsen der Primärblätter beschleunigt wird. Nach sieben Tagen haben die Keimlinge eine Länge von acht bis zehn cm erreicht; die oberen vier cm der Primärblätter werden jetzt für die Untersuchungen abgeschnitten.

b. Belichtung

Zur Belichtung wurden Primärblätter einheitlicher Länge in Portionen von 1 g Frischgewicht in Petrischalen gegeben, deren Boden mit aqua dest. bedeckt war. Die Temperatur dieser Schalen und ihres Inhalts wurde durch ein Wasserbad auf $\pm 1^{\circ}$ C konstant gehalten.

c. Lichtquellen

Die Lichtquellen waren in einem Aluminium-Reflektor angebracht. Bei den Starklichtversuchen wurde zur Absorption der Wärmestrahlung zwischen Lampe und Versuchsobjekt eine flache Schale mit einer etwa fünf cm tiefen fließenden Wasserschicht gestellt.

Für die verschiedenen Belichtungsarten wurden Lichtquellen mit folgenden technischen Daten verwendet:

1. Weißlicht: Leuchtstoffröhren Osram, HNW, 40 Watt
2. Starklicht: Osram-Lampe, 1000 Watt

Farbiges Licht wurde durch Filter erzeugt, die vor die Weißlichtquelle (s.O.) geschoben werden konnten. Die spektrale Durchlässigkeit dieser Filter ist in Abb. 29 wiedergegeben.

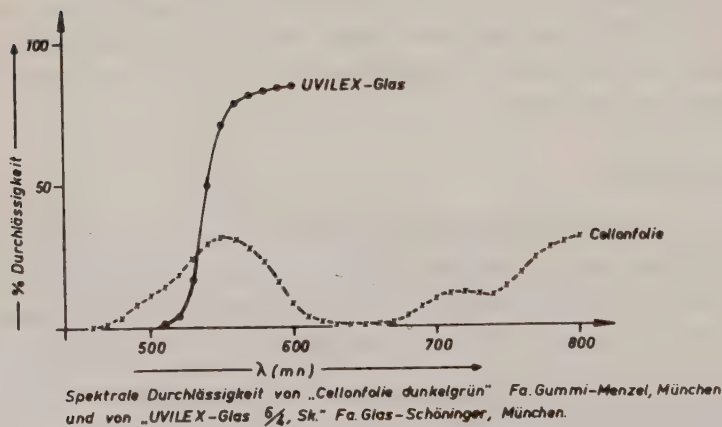
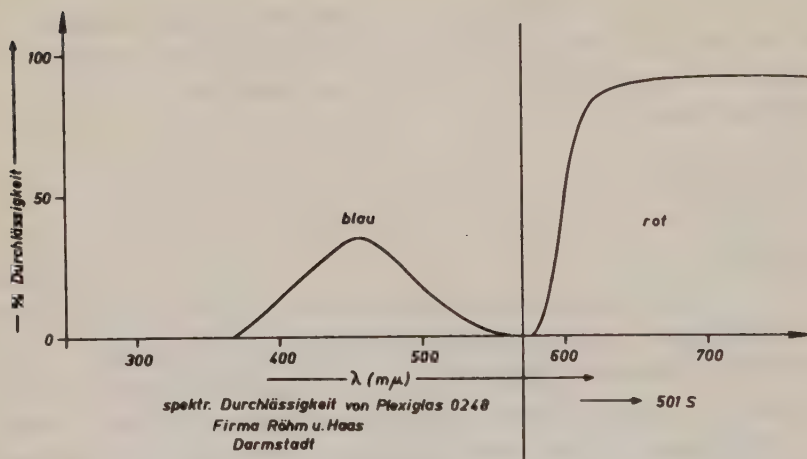


Abb. 29
Spektrale Durchlässigkeiten

3. Rotlicht: Plexiglasfilter 501S (Fa. Röhm & Haas, Darmstadt)
4. Blaulicht: Plexiglasfilter 0248 (Fa. Röhm & Haas, Darmstadt)
5. Grünlicht: Cellonfolie dunkelgrün (Fa. Gummi-Menzel, München),
zusammen mit UVILEX-Glas 6/4, Sk. (Fa. Glas-Schöninger, München)

Die Lichtintensitäten sind entweder mit dem Luxmeter oder der Thermosäule (Mollsche Großflächenthermosäule Type E1 Fa. Kipp, Delft-Holland) und einem darauf geeichten Galvanometer (Multiflex-Galvanometer Type MGF O, Fa. Dr. B. Lange) gemessen worden.

d. Diphenylamin- und Streptomycin-Inkubation

Die Primärblätter wurden in einer 10^{-2} m Saccharoselösung mit 10^{-4} m Diphenylamin (Merck 3086) bzw. 10^{-3} m Streptomycin (Streptomycinsulfat, Farbwerke Hoechst) inkubiert. Erste Versuche ohne Saccharose ergaben, daß nach achttündiger Inkubation die Gewebestücke so verarmt waren, daß sie nur noch schwache Reaktionen zeigten.

Zur Erhöhung der Resorption wurden die Primärblätter bei 23° C und Dunkelheit acht Stunden lang in den betreffenden Lösungen geschüttelt (von einer kurzen Infiltration wurde abgesehen, weil das Gewebe so stark geschädigt wurde, daß keine vergleichbaren Reaktionen mehr auftraten), bevor die verschiedenen Belichtungen erfolgten.

B. Blattfarbstoffextrakte

1. Herstellung

Die zu untersuchenden Pflanzenteile werden in Aceton homogenisiert und anschließend durch ein Filterpapierscheibchen (Schleicher u. Schüll 602 e.h.), das in ein an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenes Seitz-Druckfilter eingespannt ist, filtriert. Das klare Filtrat wird bei Raumtemperatur auf ein definiertes Volumen eingengt und mit einer Pipette in einer Startlinie auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Dabei kann das Abdampfen des Lösungsmittels mit einem Kaltluftstrom beschleunigt werden.

Bei den Verteilungschromatographischen Platten (200 x 200 mm) wird ein Extrakt aus etwa 0,5 g Frischgewicht grünen Blattmaterials noch gut getrennt. Bei den Adsorptionsschromatographischen Platten empfiehlt es sich, etwas weniger aufzutragen.

2. Verseifung

Der zu verseifende Farbstoffextrakt wird aus grünen Avena-Keimlingen hergestellt und so eingengt, daß der Extrakt aus 0,5 g Frischgewicht in 10 ml Aceton enthalten ist. Dieses Volumen wird mit 1 ml methanolischer KOH versetzt, deren Konzentration zwischen 0 % und 12 % variiert wurde; anschließend wird der Extrakt unter Stickstoff zehn Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur geschüttelt. Daran anschließend verdünnt man den Extrakt mit 10 %iger Ammoniumsulfatlösung und schüttelt ihn wiederholt gegen Petroläther aus, bis alle unverseiften Farbstoffe in den Petroläther übergegangen sind. Nun wird der vereinigte Petrolätherextrakt durch wiederholtes Ausschütteln mit aqua dest. vom KOH befreit (Indikator: Phenolphthalein), auf ein definiertes Volumen im Vakuum eingengt und chromatographiert.

C. Dünnschichtchromatographie

1. Bereitung der Dünnschichten und Trennmittelgemische

Mit Hilfe des Ausstreichgerätes der Firma C. Desaga, Heidelberg, werden Glasplatten (200 x 50 mm oder 200 x 200 mm; Dicke 4 mm) mit den nachstehend beschriebenen Gemischen in einer Schichtdicke von 125 μ bestrichen.

a. Verteilungschromatographie

aa. Trägermaterial:

12 g Kieselgur G für Dünnschichtchromatographie nach Stahl
(Merck 8129)

3 g Kieselgel "unter 0,08 mm" für Chromatographie (Merck 7729)

3 g CaCO_3 p.a. (Merck 2066)

0,01 g Ca(OH)_2 p.a. (Merck 2047)

55 ml wäßrige Ascorbinsäurelösung $8 \times 10^{-3} \text{ M}$

Der pH-Wert des wäßrigen Gemisches beträgt 7,1 - 7,4. Nach kurzem Antrocknen (10 Min.) werden die Platten 1 1/2 Std. bei höchstens 60° C getrocknet. Während des Trocknens ist für guten Abzug der feuchten Luft zu sorgen. Nach dem Abkühlen sind die Platten gebrauchsfertig. Da die Wirksamkeit der Ascorbinsäure auf den Platten trotz Aufbewahrung im Dunkeln nach einigen Stunden abzunehmen beginnt, sind die Platten vor jedem Versuch frisch hergestellt worden.

ab. Entwicklergemisch:

100 ml Benzin (Kp. 100 - 140° C)

10 ml Isopropanol

0,25 ml aqua dest.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, zunächst das aqua dest. mit dem Isopropanol zu mischen, bevor beides zu dem Benzin gegeben wird.

Die Chromatogramme werden aufsteigend in gut verschlossenen Glasküvetten entwickelt. Die Laufzeit beträgt etwa 50 Min. bei Raumtemperatur.

b. Adsorptionschromatographie
.....

ba. Trägermaterial:

25 g CaCO_3 p.a. (Merck 2066)
5 g MgO p.a. (Merck 5865)
2,5 g Ca(OH)_2 p.a. (Merck 2047)
45 ml aqua dest.

Die Platten werden sofort in einem vorgeheizten Trockenschrank bei 110°C 45 Min. getrocknet und sind dann nach dem Abkühlen gebrauchsfertig. Da die Dünnschicht hygroskopisch ist, nimmt ihre Aktivität und damit ihre Brauchbarkeit nach einigen Stunden ab, so daß auch diese Platten vor jedem Versuch frisch bereitet werden müssen.

Es sei darauf hingewiesen, daß die großtechnische Herstellungsart des CaCO_3 von Einfluß auf seine Mikrostruktur und damit auf die Brauchbarkeit für die beschriebenen Trennungen ist, die nur gut mit dem Merck-Präparat erfüllt wird.

bb. Trennungsmittel für die

Xanthophylle	Carotine
50 ml Benzin (Kp. $100 - 140^\circ \text{C}$)	40 ml Benzin (Kp. $100 - 140^\circ \text{C}$)
40 ml Chloroform	
35 ml Aceton	10 ml Benzol
	1 ml Aceton

Die aufsteigend entwickelten Chromatogramme benötigen eine Laufzeit von 90 Min. bei Raumtemperatur.

2. Elution der getrennten Farbstoffe vom Trägermaterial

Die Farbstoffzonen werden möglichst schnell durch Abschaben in Lösungsmittel überführt. Dann wird mit Hilfe eines Unterdrucks (Wasserstrahlpumpe) durch eine Glasfritte (G3 , 12 mm $\varnothing$) in ein graduiertes Reagenzglas filtriert und das Trägermaterial bis zur Farblosigkeit nachgewaschen. Die Elution ist quantitativ.

Als Lösungsmittel werden für die Chlorophylle Aceton p.a., für die Xanthophylle Äthanol p.a. und für die Carotine Chloroform p.a. verwendet. Die auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Farbstofflösungen sind bis zu ihrer Extinktionsmessung gut verschlossen. dunkel und kühl aufzubewahren.

D. Charakterisierung der Pigmente

1. Messung der Spektren

Nach Elution der getrennten Farbstoffe aus dem Trägermaterial der Dünnschichten wurden ihre Spektren im BECKMAN-Spektralphotometer (Modell DB) mit automatischem Schreiber oder im ZEISS-Spektralphotometer (Modell PMQ II) ausgemessen oder für quantitative Serienanalysen die Extinktion bei $\lambda_{\max}$ im BECKMAN-Spektralphotometer (Modell B) bestimmt und die Konzentration der Pigmente nach der von GOODWIN (PAECH-TRACEY 1955) angegebenen Beziehung errechnet:

$$\frac{E \times Z \times 1000}{W \times d \times E_1 \frac{\%}{\text{cm}}} = \mu\text{g Pigment}/100 \text{ mg Trockengewicht}$$

E = gemessene Extinktion

Z = ml reine Pigmentlösung

W = Trockengewicht in g

d = Schichtdicke der Meßküvette

$E_1 \frac{\%}{\text{cm}}$ = spezifischer Absorptionskoeffizient

Bei den adsorptionschromatographischen Pigmentanalysen wurden die Chlorophylle aus dem Gesamtextrakt in Aceton bestimmt (MACKINNEY in PAECH-TRACEY 1955).

$$C_a = 12,7 \times E_{663} - 2,58 \times E_{645} \text{ mg/l}$$

$$C_b = 22,8 \times E_{645} - 4,67 \times E_{663} \text{ mg/l}$$

Folgende spezifische Absorptionskoeffizienten wurden verwendet (GOODWIN 1955 in "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. III):

Pigment	$\lambda_{\max}$	spez. Absorpt. K.	Lösungsmittel	Literatur
B-Carotin	466	2.200	Chloroform	GILLAM und JUCKER 1935
Violaxanthin	441	2.500	Äthanol	KARRER 1943
Lutein	446	2.540	Äthanol	ZSCHEILE 1942
Zeaxanthin	451	2.480	Äthanol	ZSCHEILE 1942
Antheraxanthin (Lutein-5,6-epoxid)	446	2.400	Äthanol	STRAIN 1938
Neoxanthin	439	2.270	Äthanol	STRAIN 1938

Da für Antheraxanthin noch kein spez. Absorptionskoeffizient in Äthanol angegeben wird, wurde näherungsweise der des Lutein-5,6-epoxids verwendet.

2. Isomerisierung mit Jod

Unter der Einwirkung von Jod lagern sich die Carotinoide in ihre cis-trans-Isomere um. Hierfür wird eine 0,1 %ige Jodlösung in Petroläther verwendet. Etwa 4 - 6 μg Pigment gelöst in 5 ml Petroläther werden mit 3 - 6 Tropfen dieser Jodlösung versetzt und nach einer Stunde chromatographiert. Die neben dem Ausgangspigment im Chromatogramm erhaltenen Banden werden eluiert und ihre Spektren ausgemessen (GOODWIN 1955 in "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. III).

3. Isomerisierung mit Salzsäure

Die Umlagerung der Epoxide in ihre furanoide Form wurde in 0,01 n HCl in Chloroform durchgeführt. Nach der Blaufärbung wurde chromatographiert und die Verschiebung des Absorptionsspektrums ausgemessen. Die Verschiebung ins kurzwellige Spektralgebiet beträgt für Mono-epoxide durchschnittlich 21 nm, für Di-epoxide etwa das Doppelte (KARRER und JUCKER 1948).

Im Mikromaßstab wird auf Epoxide geprüft, indem man einige Tropfen der Pigmentlösung auf ein Filter- oder Chromatographierpapier auftropft und den Papierstreifen anschließend über HCl-Dampf hält. Die epoxidischen Pigmente färben sich blau.

E. Statistische Absicherung der Ergebnisse

Die Meßergebnisse wurden auf ihre Signifikanz geprüft und abgesichert, indem der mittlere Fehler $\bar{G}$ des jeweiligen arithmetischen Mittels $\bar{X}$ nach der Formel $\bar{G} = \sqrt{d^2/n(n-1)}$ berechnet wurde, wobei d die Differenz aus dem Meßwert X und dem arithmetischen Mittel $\bar{X}$ der Meßreihe ist und n die Anzahl der Einzelmessungen.

Im allgemeinen ist $\bar{X}$ als ein gesicherter Wert anzusehen, wenn das Verhältnis $t = \bar{X}/\bar{G}$ die Bedingung $t \geq 3$ erfüllt (t-Test nach STUDENT). Analog wurde verfahren, wenn es zu prüfen galt, ob die Mittelwerte zweier Meßreihen signifikant verschieden waren:

$$F = \sqrt{G_1^2 + G_2^2}; \quad \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{F} = t_F; \quad t_F = 3$$

In folgendem wurde beispielsweise für alle anderen Meßergebnisse die Fehlerrechnung durchgeführt:

Avena sativa 0 - 8 Std. mit Weißlicht belichtet

X = γ Zeaxanthin pro 0,1 g Trockengewicht

$$n(n-1) = 5 \times 4 = 20$$

	X	d	d ²	
0 Std.	4,0	0,7	0,49	$\bar{X}_0 = 23,8 : 5 = 4,7$ ===
	5,7	1,0	1,00	$\bar{G}_0 = \sqrt{2,47 : 20} = \sqrt{0,12} = 0,35$ =====
	4,4	0,3	0,09	$t_0 = 4,7 : 0,35 = 13,2$ =====
	5,5	0,8	0,64	
	<u>4,2</u>	0,5	<u>0,25</u>	
	23,8		2,47	
1 Std.	5,1	1,6	2,56	$\bar{X}_1 = 33,4 : 5 = 6,7$ ===
	6,7	0	0	$\bar{G}_1 = \sqrt{4,03 : 20} = \sqrt{0,20} = 0,45$ =====
	6,6	0,1	0,01	$t_1 = 6,7 : 0,45 = 14,9$ =====
	7,2	0,5	0,25	
	<u>7,8</u>	1,1	<u>1,21</u>	
	33,4		4,03	
2 Std.	7,9	0,7	0,49	$\bar{X}_2 = 44,4 : 5 = 8,9$ ===
	8,4	0,5	0,25	$\bar{G}_2 = \sqrt{2,23 : 20} = \sqrt{0,11} = 0,33$ =====
	9,8	0,9	0,81	$t_2 = 8,9 : 0,33 = 27$ ==
	9,3	0,4	0,16	
	<u>9,0</u>	0,1	<u>0,01</u>	
	44,4		2,23	

	<u>x</u>	<u>d</u>	<u>d²</u>
4 Std.	7,0	0,3	0,09
	6,3	1,0	1,00
	8,2	0,9	0,81
	7,2	0,1	0,01
	<u>8,1</u>	0,8	<u>0,64</u>
	36,8		2,55

$$\bar{x}_4 = 36,8 : 5 = 7,3$$

$$s_4 = \sqrt{2,55 : 20} = \sqrt{0,13} = 0,36$$

$$t_4 = 7,3 : 0,36 = 20,3$$

8 Std.	3,8	0,6	0,36
	3,4	0,2	0,04
	2,7	0,5	0,25
	3,0	0,2	0,04
	<u>3,1</u>	0,1	<u>0,01</u>
	16,0		0,70

$$\bar{x}_8 = 16,0 : 5 = 3,2$$

$$s_8 = \sqrt{0,7 : 20} = \sqrt{0,035} = 0,19$$

$$t_8 = 3,2 : 0,19 = 17$$

$$F_{0-1} = 0,35^2 + 0,45^2 = 0,32 \quad \bar{x}_0 - \bar{x}_1 = 2 \quad t_F = 2 : 0,32 = 6,2$$

$$F_{1-2} = 0,45^2 + 0,33^2 = 0,31 \quad \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 2,2 \quad t_F = 2,2 : 0,31 = 7,1$$

$$F_{2-4} = 0,33^2 + 0,36^2 = 0,24 \quad \bar{x}_2 - \bar{x}_4 = 1,6 \quad t_F = 1,6 : 0,24 = 6,6$$

$$F_{4-8} = 0,36^2 + 0,19^2 = 0,16 \quad \bar{x}_4 - \bar{x}_8 = 4,1 \quad t_F = 4,1 : 0,16 = 25,6$$

Eine Sicherung der arithmetischen Mittel $\bar{x}_0, \bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_4$ und $\bar{x}_8$ ergibt sich daraus, daß in jedem Fall die Bedingung $t_F \geq 3$ erfüllt wird. Da ferner die Werte $t_F \geq 3$ sind, können auch die Differenzen der Kurvenpunkte $\bar{x}_0 - \bar{x}_1, \bar{x}_1 - \bar{x}_2, \bar{x}_2 - \bar{x}_4$ und $\bar{x}_4 - \bar{x}_8$ als gesichert angesehen werden.

VII. Diskussion

A. Trennmethodik

Die Auftrennung von Chloroplastenfarbstoffen beruht meist auf adsorptionschromatographischen Verfahren, die vor allem dann keine befriedigenden Ergebnisse liefern, wenn eine quantitative Erfassung der Pigmente notwendig ist. Die hauptsächlichen Fehlerquellen liegen 1. in der katalytischen Aktivität einiger anorganischer Adsorbentien, so daß es häufig zu Isomerisationsprodukten kommt. Durch die relativ lange Laufzeit der Säulen wird diese Reaktion gefördert. 2. in einer teilweise irreversiblen Adsorption einzelner Pigmente, so daß sie nicht mehr quantitativ eluiert werden können. 3. in einer unvollkommenen Auftrennung von Pigmenten gleicher Affinität zum Adsorbens, so daß diese Banden rechromatographiert werden müssen, was in jedem Fall zu Verlusten führt.

Durch die Verwendung von Zellulosepapier (HAGER 1956) an Stelle von anorganischen Adsorbentien können diese Fehler vermieden werden. Die Kapazität des Papiers ist jedoch so gering, daß entweder die Chlorophylle mangels genügender Haftpunkte die Xanthophylle teilweise übersandern, oder daß beim Auftragen geringerer Extraktmengen die Xanthophyllkonzentration für quantitative Messungen zu gering ist.

Durch die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit beschriebene Ausarbeitung einer verteilungschromatographischen Methode an Dünnschichten ist es nun möglich geworden, Pigmente geringer Konzentration neben Pigmenten hoher Konzentration in einem Trennungsgang quantitativ zu gewinnen. Durch das Beimischen von Ascorbinsäure wird die oxidative Zerstörung der Pigmente während und nach der Trennung verhindert. Da der Angriff des Luftsauerstoffes nach Abdampfen des Trennmittelgemisches jedoch wesentlich erhöht ist, sollten die Pigmente sofort nach Beendigung der Trennung in Lösungsmittel überführt werden.

Eine Stabilisierung der Pigmente erreichte EGGER (1962) durch Imprägnieren von Kieselgurschichten mit Triglyceriden, wo-

durch er eine Chromatographie mit Phasenumkehr erreichte. Die Abtrennung der Triglyceride von den lipophilen Carotinoiden ist jedoch nur durch mehrmaliges Ausschütteln möglich und daher sicherlich mit Verlusten verbunden.

Da mit der eben diskutierten verteilungschromatographischen Methode bestimmte Carotinoide aufgrund ihrer ähnlichen Löslichkeit (z.B. Lutein und Zeaxanthin, α - und β -Carotin) nicht voneinander zu trennen sind, ist auch eine adsorptionschromatographische Methode ausgearbeitet worden. Hierbei ist es durch Alkalisieren der Schicht gelungen, die Chlorophylle, die die Xanthophylle bei dieser Art der Chromatographie meist störend überlagern, am Auftragungsort zurückzuhalten. Je nach Wahl des Trennmittelgemisches trennen sich nun entweder allein die Carotine auf (Abb. 3a) und die Xanthophylle verbleiben zusammen mit den Chlorophyllen am Start, oder die Carotine wandern gemeinsam an der Front und die Xanthophylle sind in scharfen Zonen über die Platte verteilt (Abb. 3b). Durch ein geeignetes Gemisch von Adsorbentien und die sehr kurze Laufzeit konnte eine irreversible Adsorption und eine Isomerisation der Pigmente vermieden werden.

Die Kapazität der Platten ist für quantitative Untersuchungen ausreichend. Es kann je Chromatogramm der Extrakt von 0,4 g frischen Blattmaterials aufgetragen werden. Der Anteil der einzelnen Carotinoide liegt dann in einem Bereich zwischen etwa 2 μ g (z.B. Zeaxanthin) und 23 μ g (z.B. Lutein).

B. Quantitative Veränderungen von Chloroplastenpigmenten

Die im vorhergehenden diskutierte quantitative Trennmethode ließ den Ergebnissen der im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche einen hohen Aussagewert zukommen. Dabei ergab sich bei der Belichtung etiolierter Avena-Keimlinge eine wahrscheinliche Wechselbeziehung zwischen den drei Xanthophyllen Zeaxanthin, Antheraxanthin (Zeaxanthin- m o n o - epoxid) und Violaxanthin (Zeaxanthin- d i -epoxid), wie im folgenden diskutiert werden soll.

Eine Umwandlung der drei Pigmente Zeaxanthin, Lutein und Violaxanthin ist von YAMAMOTO (1961) und SAPOZHNIKOV et al. (1958, 1962) eingehend untersucht worden. SAPOZHNIKOV beschreibt die reduktive Umwandlung von Violaxanthin zu Lutein als " L i c h t - r e a k t i o n " und die oxidative Rückreaktion von Lutein zu Violaxanthin als " D u n k e l r e a k t i o n ". Allerdings spricht SAPOZHNIKOV von Lutein statt von Zeaxanthin, was damit zu erklären ist, daß es ihm möglicherweise nicht gelang, das Zeaxanthin vom Lutein zu trennen. EIDL'MAN et al. (1963), SAPOZHNIKOV et al. (1962) und KHODZHAYEO (1963) berichten weiter, daß die Lichtreaktion abhängig ist vom Chlorophyllgehalt und daß sich ihre Intensität mit zunehmender Belichtungsdauer und steigendem Chlorophyllgehalt vergrößert, um je nach Pflanzenart zwischen drei und fünf Stunden ihr Maximum zu erreichen.

Diese Ergebnisse dürften in Zusammenhang stehen mit der lichtabhängigen Umwandlung von Proplastiden zu intakten Chloroplasten und der damit entstehenden photosynthetisch wirksamen Einheit von Chlorophyll, Carotin, Protein und Lipiden. Diese Chloroplastendifferenzierung vollzieht sich in drei Schritten (KLEIN et al. 1964, VIRGIN 1963): 1. Bildung prolamellarer Körper und Bildung von Protochlorophyll im Dunkeln. 2. eine zwei- bis dreistündige Phase, in der Primäranlagen gebildet werden und nur wenig Chlorophyll entsteht, da das vorhandene Protochlorophyll nach seiner schnellen Umwandlung nur langsam nachgebildet wird. Für diese Vorgänge genügt eine kurze Lichtinduktion. Nach GABRIELSEN et al. (1961) und MADSEN (1964) wird durch alternierendes Licht-Dunkel die Induktion des Photosynthesemechanismus im Vergleich zu einer

Dauerbelichtung gefördert. Die Proteinsynthese fällt vor allem in diese zweite Phase (RILLING 1962). 3. Während eines wiederum zwei- bis dreistündigen lichtabhängigen Schrittes findet die Granaformation statt und gleichzeitig eine intensive Vermehrung von Chlorophyll a. In diesem dritten Zeitabschnitt wird die hauptsächliche Carotinoidsynthese, die erst durch die Enzymsynthese im zweiten Schritt induziert wird, durchgeführt (RILLING 1962). Vergleichend darf nun gesagt werden, daß der zweite Schritt der Chloroplastendifferenzierung zeitlich mit der hier beschriebenen ersten Belichtungsphase zusammenfällt. Die während dieser Zeit beobachtete erhöhte Zeaxanthinbildung kann auf eine Photoreduktion ("Lichtreaktion") von Violaxanthin und Antheraxanthin zu Zeaxanthin zurückgeführt werden, die hier jedoch von einer durch die Proteinsynthese bedingten enzymatischen Carotinoidbiosynthese überlagert wird (RILLING 1962), so daß keine Abnahme des Violaxanthins zu verzeichnen ist (Abb. 23). Die Carotinoid-Neusynthese ist auch von GOODWIN (1958) in Isotopenversuchen an etiolierten Keimlingen nachgewiesen worden.

Für das Vorliegen einer Photoreduktion der Epoxide spricht ferner der Starklichtversuch (Abb. 24), in dem das neugebildete Zeaxanthin quantitativ der Abnahme von Violaxanthin und Antheraxanthin entspricht. Am Ende der ersten Phase stehen $17 \mu\text{g}$ neugebildetem Zeaxanthin einem Verlust von 6 g Antheraxanthin und $10 \mu\text{g}$ Violaxanthin gegenüber. Ferner ergibt sich aus den Rotlichtversuchen (Abb. 25) eine Beteiligung des Chlorophylls an der Lichtreaktion, wofür auch die vorhergehend referierten Befunde von KHODZHAYEO (1963) sprechen.

Die zweite Weißlichtphase der eigenen Versuche, die dem dritten Schritt der Chloroplastenentwicklung entsprechen dürfte, führt zur Ausbildung des intakten photosynthetischen Apparates, in welchem sich nach etwa zwölfstündiger Belichtung ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen Reaktionspartnern einstellt. Diese Phase bringt nun eine Umkehrung der eben geschilderten Veränderungen, nämlich eine Abnahme der Zeaxanthin- und Antheraxanthinkonzentrationen und eine Zunahme des Violaxanthins. Offensichtlich handelt es sich hier nicht um eine lichtabhängige Oxidation, sondern um eine durch die Proteinsynthese gesteuerte Reaktion, die die Photo-

reduktion der ersten Belichtungsphase aufhebt. Hierfür sprechen verschiedene Befunde: während Rotlicht sich wie Weißlicht auswirkt, also eine chlorophyllabhängige Photoreduktion von Violaxanthin und Antheraxanthin und damit eine Zeaxanthin z u n a h m e induziert (Abb. 25), wird im Blaulicht eine A b n a h m e des Zeaxanthins in b e i d e n Belichtungsphasen beobachtet. Diese Abnahme könnte durch ein Enzym induziert werden, welches im Zuge der im Blaulicht verstärkt einsetzenden Proteinbiosynthese (BERGFELD 1963) neu gebildet oder aktiviert wird. Da hierzu parallel, wie vorhergehend beschrieben, die Neusynthese der Carotinoide verläuft und sich zu den Produkten der Zeaxanthinoxidation addiert, wird nach acht Stunden Belichtung eine höhere Violaxanthinzunahme als Zeaxanthinabnahme festgestellt. Diese Oxidation des Zeaxanthins dürfte mit der von SAPOZHNIKOV (1962) für intakte Chloroplasten beschriebenen " D u n k e l r e a k t i o n " identisch sein. Für Enzymbeteiligungen an dieser Zeaxanthinoxidation sprechen neben verstärkter Zeaxanthinabnahme bei Temperaturerhöhung (Abb. 28) Versuche mit Streptomycin. Da Streptomycin die Chloroplastendifferenzierung weitgehend hemmt (GOODWIN 1959; METZNER und SENGEL 1961; MEGO 1964), obwohl geringe Mengen Chlorophyll gebildet werden, erfolgt in beiden Belichtungsphasen die Photoreduktion der Epoxide, d.h. die Zeaxanthinkonzentration steigt während der gesamten Belichtungsdauer kontinuierlich an (Abb. 27).

Zusammenfassend lassen sich die geschilderten Beobachtungen in Übereinstimmung mit den schon erörterten Befunden anderer Autoren wie folgt erklären: Während der ersten Belichtungsphase kann an dem sofort ausgebildeten und dann lichtangeregten Chlorophyll ein Reduktionsdruck entstehen, der wohl über einige Cofaktoren (z.B. Ferredoxin oder NADP) zunächst abfließen, aber in den Dunkelreaktionen der Photosynthese (CO_2 -Reduktion!) letztlich doch nicht verbraucht werden könnte, da der Photosyntheseapparat noch wenig ausgebildet ist. Der Reduktionsüberschuß könnte dann zu der beschriebenen Umwandlung von Violaxanthin und Antheraxanthin in Zeaxanthin führen. Mit fortschreitender Chloroplastendifferenzierung kommt es dann vorzugsweise im nunmehr ausgebildeten Photosyntheseapparat zu einem erhöhten Verbrauch des Reduktanten bei der Blackman-Reaktion und damit zu einer Verzögerung der Photo-

reduktion des Violaxanthins, die dann schließlich in der zweiten Phase durch die von der Proteinsynthese aktivierte enzymatische Oxidation (Dunkelreaktion) und Carotinoid-Biosynthese überlagert wird, was gleichbedeutend mit einer Abnahme des Zeaxanthins und einer Zunahme des Violaxanthins ist.

VIII. Zusammenfassung

A. Trennmethodik

Es werden zwei Methoden zur Trennung von Chloroplastenfarbstoffen ausgearbeitet, die eine quantitative und schnelle Erfassung der einzelnen Pigmente ermöglichen. Die hierbei erhaltenen Trennverfahren an Dünnschichten sind je nach Art der Trägerschichten und dem daraus resultierenden physikalischen Trennprinzip als Verteilungs- oder Adsorptionschromatographie anzusprechen.

Die verteilungschromatographische Methode erlaubt in nur 45 Minuten Laufzeit die Trennung folgender Avena-Chloroplastenpigmente: 1. Neoxanthin und Neoxanthin-Isomeres, 2. Violaxanthin, 3. Antheraxanthin, 4. Lutein und Zeaxanthin, 5. Chlorophyll b, 6. Chlorophyll a, 7. β -Carotin. Eine oxidative Veränderung der Pigmente an der stark oberflächenvergrößerten Trägerschicht wurde durch Zugabe eines wasserlöslichen Antioxidans (Ascorbinsäure) verhindert (Abb. 1).

Bei dieser Verteilungschromatographie ist naturgemäß die Auftrennung von Carotinoiden mit gleichem Verteilungskoeffizienten nicht möglich. Es wurde deshalb zusätzlich eine adsorptionschromatographische Methode ausgearbeitet, bei der es gelungen ist, die störenden Chlorophylle am Auftragungsort durch die Basizität der Adsorptionsschicht zurückzuhalten.

Die adsorptionschromatographische Methode macht nach der alkalischen Verseifung der Chlorophylle, die hier unmittelbar auf der Dünnschichtplatte erfolgt, die Trennung folgender Xanthophylle in einem einzigen Chromatogramm möglich: 1. Rhodoxanthin, 2. Zeaxanthin, 3. Neoxanthin, 4. Neoxanthin-Isomeres, 5. Antheraxanthin, 6. Lutein, 7. Violaxanthin, 8. Lutein-5,6-epoxid, 9. α -Kryptoxanthin, 10. α -Carotin-mono-epoxid (Abb. 3b).

Auf gleicher Adsorptionsschicht, jedoch mit verändertem Fließmittel, konnten folgende Carotine voneinander getrennt werden: 1. Lycopin, 2. γ -Carotin, 3. ξ -Carotin, 4. β -Carotin, 5. α -Carotin (Abb. 3a).

Die Pigmente lassen sich quantitativ aus dem Trägermaterial eluieren und werden aufgrund ihrer Spektren, ihrer Wanderungsgeschwindigkeit sowie durch Isomerisierungen mit Jod und Salzsäure charakterisiert.

Die Methode erlaubt den Nachweis, daß die bisher in der Literatur beschriebene Lutein-5,6-epoxid-Bande überwiegend aus Antheraxanthin besteht, dem je nach Herkunft des Pflanzenmaterials wechselnde Mengen Lutein-5,6-epoxid beigemengt sind.

B. Quantitative Veränderungen von Chloroplastenpigmenten

Die schon öfters beschriebene Xanthophyllzunahme in Sonnenblättern höherer Pflanzen wurde genauer untersucht. Bei einem Vergleich stark belichteter gegenüber im Schatten liegender Blattteile von *Veratrum album* zeigt sich, daß die Vermehrung der Xanthophylle auf eine Erhöhung der Konzentration von Antheraxanthin und Lutein zusammen mit Zeaxanthin zurückzuführen ist. Ferner ist festgestellt worden, daß die einzelnen Carotinoide in den "photolabilen" Varianten von *Thuja occidentalis* im gleichen prozentualen Verhältnis (bezogen auf die Gesamtcarotinoide) vorliegen wie in den "photostabilen"; ihre Gesamtmenge ist in den "photolabilen" Varianten jedoch verringert. Für das Verhältnis von Sonnen- zu Schattenseite gilt bei beiden Varianten das über *Veratrum album* Gesagte.

Während einer Belichtung etiolierter *Avena*-Primärblätter mit Weißlicht über einen Zeitraum von acht Stunden ist sowohl eine sofort einsetzende und linear ansteigende Chlorophyllsynthese als auch eine verstärkte Neusynthese der Carotinoide festgestellt worden. Daneben ist während der ersten zwei Belichtungsstunden eine Umwandlung von Violaxanthin zu Antheraxanthin und Zeaxanthin zu beobachten, für die eine Photoreduktion als wahrscheinliche Ursache diskutiert wird. Durch Erhöhung der Lichtintensität (Starklichtversuche) tritt diese Photoreduktion so sehr in den Vordergrund, daß eine klare quantitative Beziehung der drei Reaktionspartner zueinander nachweisbar wird: die Zeaxanthinzunahme entspricht mengenmäßig der Summe der Violaxanthin- und Antheraxanthinabnahme.

Diese lichtabhängige Reduktion wird in den folgenden Belichtungsstunden von einer lichtunabhängigen Oxidation von Zeaxanthin zu Antheraxanthin und Violaxanthin überlagert. Da einerseits durch die Hemmung der Chlorplastendifferenzierung mit Streptomycin gleichzeitig die Oxidation des Zeaxanthins gehemmt wird und andererseits durch Temperaturerhöhung die Oxidation des Zeaxanthins beschleunigt werden kann, werden für diese lichtunabhängige Oxidation Enzymsysteme verantwortlich gemacht, deren Ausbildung im Laufe der Chloroplastendifferenzierung erfolgen muß.

IX. Literaturverzeichnis
=====

- ANDROES, G.M., SINGLETON, M.F., BIGGINS, J. and CALVIN, M.
Photo-Induced Elektron Paramagnetic Resonance in
Mutant Photosynthetic Species Lacking Carotenoids
or Chlorophyll.
Biochem. Biophys. Acta 66, 180-187 (1963)
- ANGAPINDU, A., SILBERMAN, H., TANTIVATANA, P. and KAPLAN, I.R.
The Separation of Chlorophylls by Paper and
Cellulose Column Chromatography.
Arch. Biochem. Biophys. 75, 56-68 (1958)
- ASAMI, M.
On the Paper Chromatography of the Leaf Pigments.
Bot. Mag. 65, 771 (1952)
- BAUER, L.
Trennung der Carotinoide und Chlorophylle mit Hilfe
der Papierchromatographie.
Naturwiss. 39, 88 (1952)
- BERGFELD, R.
Die Wirkung von hellroter und blauer Strahlung auf
die Chloroplastenausbildung.
Z. Naturf. 18b, 328-331 und 557-562 (1963)
- BLAAUW-JANSEN, G., KOMEN, J.G. and THOMAS, J.B. - On the Relation
between the Formation of Assimilatory Pigments and
the Rate of Photosynthesis in Etiolated Oat Seedlings.
Biochem. Biophys. Acta 5, 179-185 (1950)
- CHOLNOKY, L., SZABOLCS, J. und NAGY, E. - Untersuchungen über die Caro-
tinoidfarbstoffe IV : a-Kryptoxanthin.
Liebigs Ann. Chem. 616, 207-218 (1958)
- CHOLNOKY, L. und SZABOLCS, J. - Untersuchungen über die Carotinoid-
farbstoffe V : Über Farbstoffe der Kelchblätter von
Physalis Alkekengi.
Liebigs Ann. Chem. 626, 206-215 (1959)
- CHOLNOKY, L., SZABOLCS, J. und TIMÁR, M. - Untersuchungen über die
Carotinoidfarbstoffe VI: Identität des "Phycoxan-
thins" mit Neo-β-Kryptocanthin A
Liebigs Ann. Chem. 663, 202-210 (1963)
- COUSDEN, R., GORDON, A.H., MARTIN, A.J.P. - Qualitative Analysis of
Proteins: a Partition chromatographic Method Using
Paper
Biochem. J. 38, 224 (1944)

- DOUIN, R. Analyse chromatographique sur papier des pigments chlorophylliens.
Rev. gén. Bot. 60, 777 (1953)
- EGGER, K. Dünnschichtchromatographie der Chloroplastenpigmente.
Planta 58, 664-667 (1962)
- EIDL'MAN, Z.M. and KHODZHAYEO, A.S. - The Dynamics of the Photo-reaction of Mutual Transformations of Xanthophylls during the Process of virescence.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 150(4), 928-930 (1963)
(BWB 215(2), 187 (1964)
- GABRIELSEN, E.K., MADSEN, A. and VEJLBY, K. - Induction of Photosynthesis in Etiolated Leaves.
Phys. Plant. 14, 98-110 (1961)
- GOODWIN, T.W. Carotinoids: in Peach, K. und Tracey, M.V. - Moderne Methoden der Pflanzenanalyse.
Bd. III, 272-311, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
- GOODWIN, T.W. Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$, $[2-^{14}\text{C}]$ Acetat and $[2-^{14}\text{C}]$ Mevalonic Acid into β -Carotene in Etiolated Maize Seedlings.
Biochem. J. 68, 26p (1958)
- GOODWIN, T.W. The Biosynthesis and Function of the Carotenoid Pigments.
Advances in Enzymology 21, 295-368 (1959)
- GROB, E.C., EICHENBERGER, W. und PFLUGSHAUPT, R.P. - Zur Bildung der Carotinoide in Blättern, Blüten und Früchten.
Chimia 15, 565-566 (1961)
- GROB, E.C. und PFLUGSHAUPT, R.P. - Beiträge zur Chemie der Carotinoide I Säurekatalytische Reaktion an hydroxylhaltigen Carotinoiden
Helv. chim. Acta 45(185), 1592-1598 (1962)
- HAGER, A. Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe.
Planta 48, 592-621 (1957)
- HAGER, A. Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen.
Planta 49, 524-560 (1957)

- HAGER, A. in: Linskens, H.F. - Papierchromatographie in der Botanik.
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1959)
- HAGER, A. und BERTENRATH, Th. - Verteilungschromatographische Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden grüner Pflanzen an Dünnschichten.
Planta 58, 564-568 (1962)
- KARRER, P. und JUCKER, E. - Carotinoide.
Verlag Birkhäuser Basel (1948)
- KHODZHAYEO, A.S. - On the Photochemical Reaction of Reciprocal Transformation of Xanthophylls in the Course of Virescence of Seedlings.
Bot. Z. 48, 1525-1527 (1963) (russisch)
(BWB 218(1), 39 (1964))
- KLEIN, Sh., Ph.D., BRYAN, G. and BOGORAD, L., Ph.D. - Early Stages in the Development of Plastid Fine Structure in Red and Far-Red Light.
The J. of Cell Biol. 22(2), 433-442 (1964)
- Fine Structural Changes in Proplastides During Photodestruction of Pigments.
The J. of Cell Biol. 22(2), 443-451 (1964)
- KRINSKY, N.J. and GOLDSMITH, T.H. - The Carotenoids of the Flagellated Alga, *Euglena gracilis*.
Arch. Biochem. Biophys. 91, 271-279 (1960)
- KUHN, R. und LEDERER, E. - Zerlegung des Carotins in seine Komponenten.
Chem. Ber. 64, 1349 (1931)
- LIND, E.F., LANE, H.C. and CLEASON, L.S. - Partial Separation of the Plastid Pigments by Paper Chromatography.
Plant Physiol. 28, 325 (1953)
- MACKINNEY, G. in Peach, K. und Tracey, M.V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse.
Bd. IV, 1959 Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
- MADSEN, A. On the Formation of Chlorophyll and Initiation of Photosynthesis in Etiolated Plants.
Photochem. Photobiol. 2, 93 (1963)

- METZNER, H. und SENGER, H. - Beeinflussung synchroner Chlorella-Kulturen durch Streptomycin und Diphenylamin.
Symposium Deutsche Bot. Ges. 1, (1962)
- MEGO, J. L. Inhibition of Greening of Heat-Bleached Euglena by Streptomycin.
Biochem. Biophys. Acta 88, 663-665 (1964)
- PEACH, K. und TRACEY, M. V. - Moderne Methoden der Pflanzenanalyse.
Bd. III und Bd. IV Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955)
- RANDERATH, K. Dünnschichtchromatographie.
Chemie Verlag, Weinheim (1962)
- RILLING, H. C. Photoinduction of Carotenoid Synthesis of a Mycobacterium Sp.
Biochim. Biophys. Acta 60, 548-556 (1962)
- RUNGE, F. G. Zur Farbenchemie.
Bd. III, Berlin (1850)
- SAPOZHNIKOV, D. J. and BAZHANOVA, N. V. - Characterization of Light Reaction in Isolated Chloroplasts.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 120, 1141-1143 (1958)
(Chem. Abstr. 52, 18684i u. 18685a (1958))
- SAPOZHNIKOV, D. J., EIDL'MAN, Z. M., BAZHANOVA, N. V., MASLOVA, T. G. and POPOVA, O. F. - Participation of Carotenoids in Photosynthesis.
Eksperim. Botan. 15, 43-52 (1962) (russisch)
(Chem. Abstr. 57, 11559d (1962))
- SCHMIDT, K., LIAAEN JENSEN, S. und SCHLEGEL, H. G. - Die Carotinoide der Thiorhodaceae.
Arch. Mikrobiol. 46, 117-126 (1963)
- SCHMIDT, K. Die Carotinoide der Thiorhodaceae.
Arch. Mikrobiol. 46, 127-137 (1963)
- SCHÖNBEIN, C. F., - Ann. Phxsiqne 114, 275 (1861)
(zitiert nach CRAMER, F.: Papierchromatographie (1958), Verlag Chemie)
- SEYBOLD, A. und EGLE, K. - Zur chromatographischen Trennmethode der Blattfarbstoffe.
Planta 29, 114 (1939)

- SHEN, Yung-Kang and HUNG, Yu-Chun - Studies on Photophosphorylation VIII.
Acta biochem. biophys. sinica 3, 466-472 (1963)
(chinesisch)
(BWB 221(1), 65 (1964))
- SIMONIS, W. Der Einfluß verschiedenfarbigen Anzuchtlichtes auf die CO₂-Assimilation und den Farbstoffgehalt von *Helodea canadensis*.
Planta 29, 192 (1939)
- SIRONVAL, L. Mesure de l'activité de la chlorophyllase par chromatographie sur papier.
Physiol. Plantarum 7, 523 (1954)
- SPOHN, H. Eine einfache Methode zur Trennung der Blattfarbstoffe.
Planta 23, 657 (1935)
- STAHL, E. Dünnschichtchromatographie.
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
- STRAIN, H.H. Leaf Xanthophylls.
Washington (1938)
- STRAIN, H.H. Chromatographic Adsorption Analysis.
New York (1945)
- STRAIN, H.H. Paper Chromatography of Chloroplast Pigments.
J. phys. Chem. 57, 638 (1953)
- STROTT, A. Der Einfluß der Umweltbedingungen auf die Ausbildung von Chloroplastenfarbstoffen.
Jb. wiss. Bot. 86, 1 (1938)
- TSWETT, M. Trav. Soc. Nat. Varsovie 14 (1903)
(zitiert nach E. LEDERER und M. LEDERER: Chromatography (1958), Elsevier Publishing Company, Amsterdam)
- TSWETT, M. Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode.
Ber. deut. Bot. Ges. 24, 384-393 (1906)
- TSWETT, M. Zur Chemie des Chlorophylls. Über Phylloxanthin, Phyllocyanin und die Chlorophyllane.
Biochem. Z. 5, 6-32 (1907)
- TSWETT, M. C. r. 152, 788 (1911) in KARRER, P. und JUCKER, E. - Carotinoide
Verlag Birkhäuser, Basel (1948)

- VILLOUTREIX, J. - Les caroténoides de *Rh. mucilaginos*a. Etude de leur biosynthèse à l'aide de l'analyse de mutants et de l'emploi d'un inhibiteur de la caroténogénèse. *Bioch. Biophys. Acta* 40, 442-457 (1960)
- VIRGIN, J.H., KAHN, A. und v.WETTSTEIN, D. - Die Physiologie der Chlorophyllbildung in Beziehung zu strukturellen Änderungen in den Chloroplasten. *Photochem. and Photobiol.* 2, 83-91 (1963)
- YAMAMOTO, H.Y., CHICHESTER, C.O. and NAKAYAMA, T.O.M. - Biosynthetic Origin of Oxygen in the Leaf Xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 645-649 (1962)
- YAMAMOTO, H.Y., NAKAYAMA, T.O.M. and CHICHESTER, C.O. - Studies on the Light and Dark Interconversion of Leaf Xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 168-173 (1962)
- ZECHMEISTER, L. und v.CHOLNOKY, L. - Die chromatographische Adsorptionsmethode. 2. Auflage Wien (1938)
- ZECHMEISTER, L. - Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes. Springer Verlag Wien 1962

Autorenverzeichnis zu den Absorptionsspektren der Chloroplastenpigmente:

1. ZSOLT, J. et al. - Canadian Journ. Biochem. and Physiol. 41,
481-485 (1963)
2. KARRER, P. und JUCKER, E. - Carotinoide -
Birkhäuser-Verlag Basel 1948
3. STRAIN, H.H. - Leaf Xanthophylls -
Washington 1938
4. HAGER, A. Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe.
Planta 48, 592-621 (1957)
5. GOODWIN, T.W. - Carotinoids - in:
Päsch-Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenphysiologie.
Springer-Verlag Berlin Bd. III, 272-311 (1955)
6. ZECHMEISTER, L. - Cis-Trans Isomeric Carotinoids, Vitamins A
and Arylpolynes -
Springer Verlag Wien 1962
7. VILLOUTREIX, J. - Les caroténoides de Rhodotorula mucilaginosa
Bioch. Biophys. Acta 40, 442-457 (1960)
8. CHOLNOKY, L., SZABOLCS, J. und NAGY, E. - Untersuchungen über die
Carotinoidfarbstoffe IV, α -Kryptoxanthin -
Liebigs Ann. Chem. 616, 207-218 (1958)
9. PARSONS, T.R. - On the pigment composition of 11 species of
maine phytoplankters -
J. Fish. Res. Bd. Canada 18, 1017-1025 (1961)
10. SCHMIDT, K., LIAAEN-JENSEN, S. und SCHLEGEL, H.G. - Die Carotinoide der Thiorhodaceae -
Arch. Mikrobiol 46, 117-126 (1963)
11. LIAAEN-JENSEN, S. und SCHMIDT, K. - Die Carotinoide der
Thiorhodaceae -
Arch. Mikrobiol 46, 138-149 (1963)

Lebenslauf.

Am 7. Dezember 1936 wurde ich, Thea Bertenrath, als Tochter des Wirtschaftsprüfers Dipl. Kfm. Dr. Ernst W. Bertenrath und seiner Ehefrau Hete, geb. Kammann, in Berlin geboren. Wegen der zunehmenden Bombenangriffe wurden meine Mutter, meine drei Geschwister und ich 1943 aus Berlin nach Feldberg-Bärental evakuiert, wo ich im Herbst des gleichen Jahres eingeschult wurde. Im Jahre 1946 verzogen wir nach Langenberg/Rhld, wo ich zunächst die Volksschule und dann von Ostern 1948 bis Ostern 1955 das städtische Gymnasium besuchte. 1955 wechselte ich auf die Wirtschaftsoberschule in Freiburg/Brsg. über und legte dort am 29. März 1958 mein Abitur ab. Für das Sommersemester 1958 wurde ich an der Universität zu Köln immatrikuliert, wo ich wie im folgenden Semester in Freiburg zunächst Wirtschaftswissenschaften studierte. Zum Sommersemester 1959 wechselte ich zur Naturwissenschaftlichen Fakultät über und studierte bis zum Wintersemester 1959/60 Biologie und Chemie in Freiburg und vom Sommersemester 1960 bis zum Sommersemester 1963 in München. Im Herbst 1961 begann ich am Botanischen Institut der Universität München mit meiner Dissertation.

